

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN
FUNCIONAL DE NUEVOS GENES IMPLICADOS
EN LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL
CORAZÓN EN EL PEZ CEBRA**

ÁLVARO GONZÁLEZ RAJAL

MARZO 2012

DIRECTOR: JOSÉ LUIS DE LA POMPA MÍNGUEZ

TUTORA: CRISTINA MURGA

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Dr. José Luis de la Pompa Mínguez en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) y en el Departamento de Desarrollo Cardiovascular y Reparación del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Para desarrollar este trabajo, el laboratorio ha recibido financiación del Ministerio de Economía y Competitividad a través de los proyectos (SAF 2004-05204, SAF 2007-62445, SAF2010-17555 y RD06/0010/1013. y “Heart Failure and Cardiac Repair” (UE FP6, REF. LSHM-CT-2005-018630). Durante los cuatro primeros años de desarrollo de este proyecto disfruté de una beca FPI asociada al proyecto SAF 2004-05204.

ÍNDICE

SUMMARY 13

INTRODUCCIÓN 17

1. REGENERACIÓN TISULAR: TIPOS Y CÉLULAS IMPLICADAS	19
2. REGENERACIÓN DE LA ALETA EN EL PEZ CEBRA	21
2.1 Fases de la regeneración de la aleta	21
2.2 Restricción de linaje durante la regeneración de la aleta	23
2.3 De-diferenciación durante la regeneración de la aleta	24
2.4 Señalización durante la regeneración de la aleta	25
2.4.1 Señalización temprana para la detección del daño: implicación de H_2O_2	26
2.4.2 La formación de la epidermis de la herida: participación de Activina β A y de IGF	26
2.4.3 Señalización por FGFs en el cierre de la herida, formación del blastema y crecimiento regenerativo	27
2.4.4 La Señalización a través de Wnt se requiere en todas las fases del proceso regenerativo	28
2.4.5 Integración de señales Fgf y Wnt en la epidermis	29
2.4.6 Las quimioquinas forman un segundo bucle de retroalimentación para regular la regeneración de la aleta	30
2.4.7 La señalización por ácido retinoico Se requiere para el cierre de la herida, la formación y mantenimiento del blastema y la formación de hueso.	30
2.4.8 La señalización por Bmp en la formación de hueso durante el crecimiento regenerativo.	30
2.4.9 La angiogénesis y el papel de VEGF en la regeneración de la aleta.	31
3. REGENERACIÓN DEL CORAZÓN EN EL PEZ CEBRA	31
3.1 El modelo de amputación del ápice del ventrículo	32

3.2	De-diferenciación y restricción de linaje durante la regeneración del corazón	33
3.3	Otros modelos	34
3.3.1	Crioinfartos	35
3.4	Señalización durante la regeneración cardiaca	37

MATERIALES Y MÉTODOS 43

1.	MANTENIMIENTO, CRÍA Y OPERACIONES EN EL PEZ CEBRA	45
2.	RECOLECCIÓN DEL TEJIDO Y EXTRACCIÓN DE RNA	45
3.	HIBRIDACIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS	45
4.	PCR CUANTITATIVA	46
5.	HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	47
6.	INYECCIÓN Y ELECTROPORACIÓN DE MORFOLINOS EN ALETAS.	47
7.	INMUNOFLUORESCENCIA Y TINCIONES HISTOLÓGICAS.	48
8.	INHIBIDORES	48
9.	GENERACIÓN DE MODELOS TRANSGÉNICOS DE PERDIDA O GANANCIA DE FUNCIÓN.	48
10.	CHOQUES TÉRMICOS EN LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS.	50

RESULTADOS 53

1.	OPERACIONES DE AMPUTACIÓN DEL ÁPICE DEL VENTRÍCULO Y AMPUTACIÓN DE LA ALETA EN EL PEZ CEBRA.	55
2.	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN Y DE LA ALETA.	55
2.1	Análisis conjunto de la regeneración del corazón y de la aleta.	57
2.2	Análisis <i>in silico</i> del transcriptoma de la regeneración cardíaca.	57
2.3	Análisis <i>in silico</i> del transcriptoma de la regeneración de la aleta.	59
3.	VALIDACIÓN DE GENES IDENTIFICADOS EN EL ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL CORAZÓN Y COMPARTIDOS POR AMBOS	

PROCESOS.	60
3.1 Genes relacionados con la matriz extracelular: fibronectina 1b, integrina α 5, periostin, ctgf y keratina 18.	60
3.2 Genes relacionados con la señalización celular: JunB, Hyou1, raldh2, midkine-a y caveolina-1.	68
4. VALIDACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN: PES	79
5. VALIDACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA: SALL1, SOX11A Y SOX11B.	80
6. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN EN LA REGENERACIÓN DE LA ALETA DE GENES SELECCIONADOS: RALDH2, MDKA, SYNDECAN-2, CAV-1 Y PTRF-CAVIN.	82
6.1 Raldh2.	83
6.2 Mdka y syndecan-2.	84
6.3 Caveolina-1 y PTRF-cavin	86
7. GENERACIÓN DE PECES TRANSGÉNICOS DE PÉRDIDA O GANANCIA DE FUNCIÓN PARA MDKA Y CAV-1 . ANÁLISIS DEL FENOTIPO RESULTANTE DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y EL CORAZÓN.	87
7.1 Generación de las líneas transgénicas mdka y cav-1 y su fenotipo durante el desarrollo embrionario.	87
7.2 Ensayos funcionales con líneas transgénicas durante la regeneración de la aleta: el papel de mdka en la regeneración.	90
7.3 Ensayos funcionales llevados a cabo con las líneas transgénicas establecidas durante la regeneración del corazón: mdka, syndecan-2 y caveolina-1.	91
7.3.1 Posición de Mdka en la cascada de señalización durante la regeneración del corazón. Relación con raldh2.	93
7.3.2 Posición de Mdka en la cascada de señalización durante la regeneración del corazón. Relación con Wt1.	95

DISCUSIÓN 99

1. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL CORAZÓN.	101
1.1 Análisis conjunto de las regeneraciones del corazón y de la aleta.	102

1.2 Análisis in silico del transcriptoma obtenido para la regeneración del corazón.	102
1.3 Análisis in silico del transcriptoma obtenido para la regeneración de la aleta.	103
2. VALIDACIÓN POR qPCR Y/O POR ISH DE GENES COMUNES A LA REGENERACIÓN CARDÍACA Y DE LA ALETA.	103
2.1 Genes relacionados con la matriz extracelular: fibronectina 1b, integrina α 5, periostin, ctgf y keratina 18.	103
2.2 Genes implicados en señalización intracelular: junB y hyou1.	105
3. VALIDACIÓN POR qPCR Y POR ISH DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN CARDÍACA: PESCADILLO.	105
4. VALIDACIÓN POR qPCR Y POR ISH DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA: SALL1, SOX11A Y SOX11B.	106
5. VALIDACIÓN FUNCIONAL DE GENES EXPRESADOS DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL CORAZÓN : CAVEOLINA-1, PTRF-CAVIN, RALDH2, MIDKINE-A Y SYNDECAN-2.	106
5.1 Caveolina-1 y PTRF-cavin en la regeneración de la aleta.	106
5.2 Caveolina-1 y PTRF-cavin en la regeneración del corazón.	107
5.3 Raldh2 en la regeneración de la aleta.	107
5.4 Raldh2 en la regeneración del corazón.	108
5.5 Mdka y syndecan-2 en la regeneración de la aleta.	108
5.6 Mdka y syndecan-2 durante la regeneración del corazón.	109
6. RELACIÓN ENTRE Wt1, RALDH2 Y MDKA EN LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN.	110

CONCLUSIONES 113

BIBLIOGRAFÍA 117

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
AER:	cresta ectodérmica apical
ARN:	ácido ribonucleico
BMP:	proteína morfogénica de huesos
BrdU:	bromo desoxi-uridina
Cav-1:	caveolina-1
Ctgf:	factor de crecimiento del tejido conectivo
dpa:	días tras la amputación
dpi:	días tras el infarto
ECM:	matriz extracelular
eGFP:	proteína verde fluorescente mejorada
EPDC:	célula derivada del epicardio
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos
Fn1:	Fibronectina 1
GFP:	proteína verde fluorescente
Hsp70:	proteína de choque térmico de 70 kilo Dalton
hpa:	horas tras la amputación
hpi:	horas tras el infarto
IGF:	factor de crecimiento insulínico
IF:	inmunofluorescencia
ISH:	hibridación in situ
Raldh2:	retinol-aldehído deshidrogenasa 2
Itg α 5:	Integrina alfa 5
kDa:	kilo Dalton
Mdka:	midkine-a
mESC:	células madre embrionarias de ratón
MO:	morfolino

Índice de abreviatutas

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

Pes: Pescadillo

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

RA: ácido retinoico

RT-PCR: reacción en reverso de la cadena de la polimerasa

Synd: syndecan

TEM: transición epitelio mesénquima

TGFb: factor de crecimiento transformante beta

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

WT: “wild type”

SUMMARY

Regeneration is a complex biological process by which animals restore the shape, structure, and function of body parts that are lost or damaged. Despite the remarkable ability to regenerate damaged structures that are observed during embryonic and newborn life, only a few vertebrate species retain a significant regenerative capacity during adulthood. Among these species, the zebrafish (*Danio rerio*) is able to regenerate organs such as the heart and the fins.

We have analyzed the gene expression profile during regeneration of heart and fin by microarray technology, and we have identified novel genes whose expression is up regulated during these processes. Some of these genes are common to both regenerative processes and others are heart- or fin-specific. Among the first group we found stress-response genes, genes related with extracellular matrix deposition and remodelling and cellular signalling pathway's genes. Among the last ones we found signaling molecules such as *raldh2*, *midkine-a* and *caveolin-1*.

In order to validate our findings we have done *in situ* hybridization and qPCR analysis. *raldh2*, *midkine-a* and *caveolin-1* expression is up regulated at 24 hours post amputation (hpa) and remains up regulated until 14 days after amputation (dpa) in hearts and 72 hpa in fins. Moreover, *syndecan-2* (a receptor for *midkine-a*) and *PTRF-cavin* (*caveolin-1* partner gene) have a closely similar pattern of expression to that of *midkine-a* and *caveolin-1* during both heart and fin regeneration. Injection of a morpholino against *raldh2*, *midkine a*, *syndecan-2*, *caveolin-1* and *PTRF-cavin* in 24hpa fins significantly impairs regeneration and proliferation. We have generated transgenic zebrafish lines carrying a dominant negative version of *Midkine-a* or *Syndecan-2* or *Caveolin-1* or *Wt1* (a gene involved in heart development that could be up-stream of *midkine-a* during heart regeneration) under the control of an inducible promoter, and we have found that these genes are required for heart regeneration upon cryoinjury. *Midkine-a* is also required for proper fin regeneration and during heart regeneration is involved along with *raldh2* in regulating inflammation response. *Raldh2* participates in the regulation of *midkine-a*'s expression during heart regeneration and probably during fin regeneration as well.

INTRODUCCIÓN

1. REGENERACIÓN TISULAR: TIPOS Y CÉLULAS IMPLICADAS

Los organismos multicelulares han desarrollado diferentes estrategias para mantener la forma y función de sus órganos a lo largo de su ciclo vital. Muchos tipos celulares son de vida corta y necesitan ser reemplazados continuamente para combatir el desgaste diario. Los ejemplos más cercanos y conocidos los encontramos en el sistema sanguíneo de los vertebrados, en el epitelio del tubo digestivo y en la piel (Stoick-Cooper et al., 2007a). Asimismo, existen muchos organismos capaces de perder partes sustanciales de su cuerpo y reemplazarlas en muchos casos repetidamente, a lo largo de su vida. Ejemplos de esto serían los ciclos de pérdida y crecimiento del exoesqueleto en los crustáceos o de la piel en las serpientes, la muda anual del plumaje en muchas aves, la pérdida y posterior crecimiento de las cuernas de los ciervos y la renovación del endometrio tras el periodo menstrual en los mamíferos. Además de todos estos fenómenos fisiológicos de reconstitución, todos los seres vivos han desarrollado estrategias para reparar daños producidos por heridas y enfermedades. El cierre de las heridas en la epidermis es un eficiente proceso de reparación que es compartido por la gran mayoría de los animales, pero la habilidad para recuperarse de daños en otros órganos y/o estructuras varía mucho y en diferente grado entre los distintos organismos. En general, existe una correlación inversa entre el desarrollo evolutivo de una especie y su capacidad regenerativa. Es decir, cuanto más primitivo es un animal, más capacidad regenerativa tiene, y viceversa (Poss, 2010).

Por regeneración se entiende el reemplazamiento de partes del cuerpo que se han perdido y la restauración de su masa, su forma y su función (Poss, 2010; Stoick-Cooper et al., 2007a). Clásicamente se ha dividido la regeneración en tres tipos: 1) epimórfica; 2) crecimiento compensatorio; y 3) regeneración de tejido (Stoick-Cooper et al., 2007a).

1) La regeneración epimórfica se produce a través de la formación de un

blastema. El blastema es una población de células “progenitoras” que surgen a partir de interacciones entre el epitelio y el mesénquima y que contiene la información morfogenética requerida para generar de nuevo el patrón perdido. Un ejemplo clásico es la regeneración de las extremidades y la cola en anfibios o de la aleta caudal en el pez cebra (Stoick-Cooper et al., 2007a).

2) Se llama crecimiento compensatorio al tipo de regeneración en la que el organismo hace frente a la pérdida de una parte del órgano que ha sido dañado, mediante un crecimiento “compensatorio” de la parte que ha quedado sana. Esto es lo que ocurre por ejemplo durante la regeneración del hígado, en la que después de haber perdido dos lóbulos, el tercero crece para compensar la pérdida de los anteriores. En este caso, los hepatocitos entran en proliferación sin la necesidad de activación de células progenitoras (Stoick-Cooper et al., 2007a).

3) La regeneración de tejido es la reparación de un daño limitado y local principalmente mediante la restauración de un único tipo celular. Es el tipo de regeneración que se da en el músculo esquelético (Stoick-Cooper et al., 2007a).

Hay varias maneras posibles por las cuales los tejidos dañados dan lugar a nuevas células y regenerar. En un primer caso, las nuevas células pueden ser producidas por células somáticas adultas al re-entrar en el ciclo celular y proliferar. Una segunda opción, que es una variante de la primera, es que las células que van a llevar a cabo la regeneración provengan de la de-diferenciación de células adultas diferenciadas, para dar lugar a células con capacidad proliferativa que se comportarían como progenitoras. Otra posibilidad es que las nuevas células provengan de células madre residentes. Se entiende por célula madre la célula que es capaz de replicarse para dar lugar a otra igual a sí misma y producir al mismo tiempo uno o varios tipos celulares diferenciados (Tanaka and Reddien, 2011). Una cuarta posibilidad es que las nuevas células aparezcan como resultado de una transdiferenciación, es

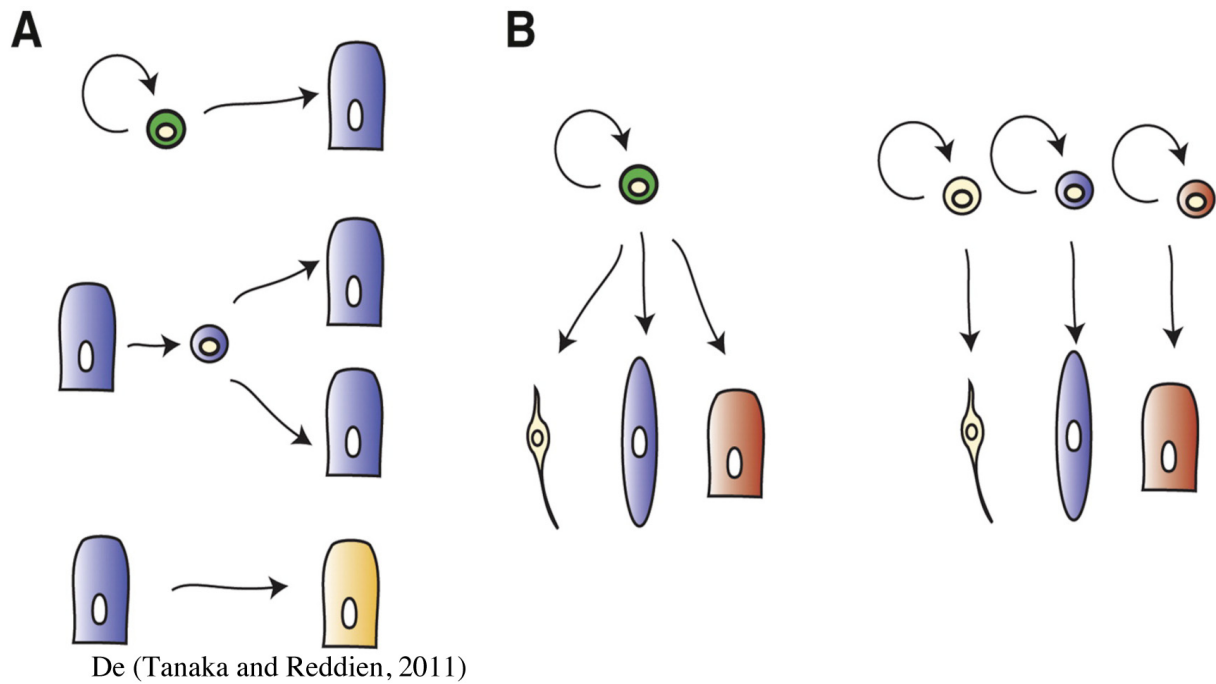


Figura 1. Fuentes de nuevas células en la regeneración.

(A) Panel de arriba: Célula madre que se automantiene y a la vez da lugar a una o varias células diferenciadas. Medio: De-diferenciación de una célula adulta para replicarse y dar lugar a nuevas células adultas diferenciadas. Abajo: Transdiferenciación de un tipo celular en otro.

(B) Distintos caminos para conseguir la pluripotencia en un tejido. Izquierda: Un único tipo de célula progenitora pluripotente da lugar a distintos tipos celulares diferenciados. Puede haber también intermediarios entre ésta y los tipos celulares finales. Derecha: distintos progenitores con linaje restringido van a aportar cada uno uno o varios tipos celulares pero siempre dentro de su mismo linaje. Se requiere la participación de todos los progenitores de linaje restringido para que la regeneración tenga lugar.

decir, por un cambio de un tipo celular a otro. Esto puede ocurrir sin que haya división celular o por medio de un progenitor que provenga de una de-diferenciación (Figura 1).

Para alcanzar la pluripotencia en la regeneración de tejidos u órganos, los tipos celulares del órgano regenerado pueden tener distintos orígenes, como es el caso de la regeneración de la extremidad en axolotes (Kragl et al., 2009), o provenir de un único tipo de células pluripotentes que originan al resto, como en el caso de planarias (Kragl et al., 2009; Wagner et al.). Igualmente en el caso de que intervengan varios “progenitores”, estos pueden dar lugar a las células que van a regenerar el órgano a través de varios mecanismos. Es decir, mientras que un progenitor aporta un tipo celular mediante transdiferenciación, otro lo puede hacer por dediferenciación y entrada en ciclo celular y un tercero puede hacerlo comportándose como una célula madre autoreplicante. (Figura 1B).

Mientras que invertebrados como la planaria, *Hydra* y los gusanos anélidos pueden regenerar totalmente, la gran mayoría de los vertebrados no son capaces de hacer nada parecido durante su vida adulta. Sin embargo, sus embriones presentan una remarcable capacidad para reemplazar estructuras dañadas, lo que parece indicar que esta capacidad se pierde en algún momento durante el desarrollo y podría estar relacionada con la maduración y desarrollo del sistema inmune (Eming et al., 2009; Harty et al., 2003). La sorprendente capacidad de algunas especies de anfibios urodelos, como el tritón, la salamandra y el ajolote mejicano de regenerar las extremidades, el corazón, la cola, la mandíbula o el cristalino, ha hecho de estos animales el modelo preferido clásicamente junto con los anfibios anuros del género *Xenopus*, para la investigación de los procesos de regeneración (Odelberg, 2005; Roy and Levesque, 2006). En particular, la regeneración de las extremidades y de la cola ha sido estudiada con especial detalle y grandes

resultados en estos animales (Beck et al., 2009; Kragl et al., 2009; Kumar et al., 2007). Los anuros, a diferencia de los urodelos, pierden la capacidad regenerativa con la madurez y también durante un periodo de su metamorfosis, lo que los hace muy interesantes para estudiar qué condiciones y programas genéticos son necesarios para que ésta tenga lugar (Stoick-Cooper et al., 2007a).

2. REGENERACIÓN DE LA ALETA EN EL PEZ CEBRA

En los últimos años han aparecido un gran número de trabajos sobre regeneración utilizando el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo. El pez cebra es capaz de regenerar diferentes órganos dañados como el corazón, las aletas, la retina, la línea lateral y la médula espinal (Poss, 2010) (Figura 2). Las ventajas del pez cebra frente a otros modelos, incluyen su pequeño tamaño y fácil mantenimiento, los grandes avances que se han producido en su embriología y su genética, que permiten llevar a cabo distintos tipos de aproximaciones, incluyendo la genética “formal” (identificación de nuevos mutantes) (Stainier, 2001) y la genética en reverso (Poss, 2010). Además, en el caso de la aleta caudal, el proceso de regeneración es muy rápido (2 semanas) (Stoick-Cooper et al., 2007a) (Figura 2B).

La aleta caudal del pez cebra está formada por un endoesqueleto basal y varios radios esqueléticos desprovistos de células (acelulares). Cada radio está formado por una serie de elementos esqueléticos acelulares llamados lepidotrichia que mineralizan directamente de la matriz de hueso de una manera equivalente a la formación de hueso intramembranoso. A este tipo de hueso se le denomina hueso dérmico. Cada radio está formado por la sucesión de varios segmentos (también llamados lepidotrichium) que a su vez están formados por dos hemirradios simétricos formando un tubo (Figura 3A). La vascularización de los radios se asegura

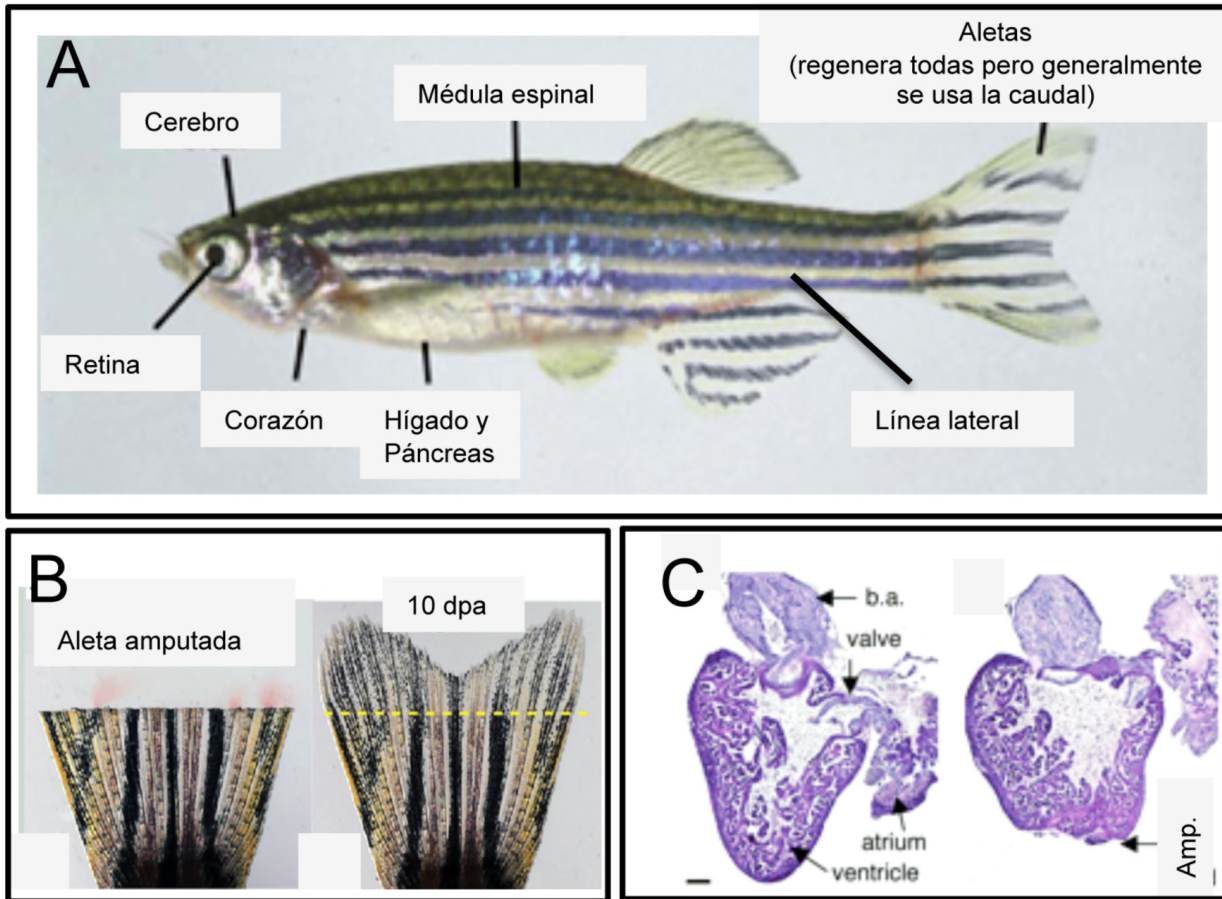
por los capilares arteriales que corren entre los hemirradios esqueléticos. Los capilares venosos se disponen fuera de los radios, en la región interradyal que conecta los lepidotrichia. Hay tendones que conectan cada segmento por su región proximal con los músculos estriados, abductores y aductores, que se encuentran en la base de la aleta. La acción coordinada de estos músculos es la responsable del control preciso de los movimientos de la aleta durante la natación. Además de los vasos sanguíneos, dentro de los radios encontramos nervios y tejido conectivo. Y en el extremo distal de la lepidotrichia está la actinotrichia, que son mechones de fibras de elastina no mineralizadas (Figura 3A). Las aletas crecen a lo largo de la vida del pez mediante la adición en el extremo distal de segmentos a cada uno de los radios, y no por un incremento en la longitud y la anchura de un número fijo de elementos esqueléticos, como en las extremidades de tetrápodos. El endoesqueleto de la aleta se encarga de soportar los radios, se localiza en la base de la aleta, se forma por osificación endocondral y tiene, por tanto, un origen cartilaginoso. El endoesqueleto no es capaz de regenerar (Akimenko et al., 2003).

Extremidades y aletas comparten gran número de tejidos como epitelio, mesénquima, radios esqueléticos, cartílago, vasos sanguíneos, nervios y tejido conectivo debido a que la aleta es la estructura que dio lugar a las extremidades en el transcurso de la evolución. Una diferencia apreciable entre las extremidades de tetrápodos y la aleta de pez cebra es que esta última no tiene músculo esquelético. A pesar de ello sigue siendo muy buen sistema modelo para estudiar la regeneración de las extremidades.

2.1 Fases de la regeneración de la aleta

La regeneración de la aleta se puede dividir en tres fases: cierre de la herida, formación de blastema y crecimiento regenerativo (Stoick-Cooper et al., 2007a) (Figura 3C).

(i) Cierre de la herida: Durante las 12 primeras horas tras la amputación (12hpa),



(C) Modificada de (Poss et al., 2002b)

Figura 2. El pez cebra es capaz de regenerar distintos órganos.

- (A) Pez cebra adulto donde se señalan las estructuras y órganos que es capaz de regenerar.
(B) La regeneración de la aleta caudal en el pez cebra se completa en 10 días.
(C) Corazón de pez cebra intacto y tras la amputación del ápice del ventrículo.

células epidérmicas migran al sitio de corte para cerrar la herida. El tejido blando existente entre los radios esqueléticos se retrae del plano de amputación mientras que los radios permanecen. Esto le da un aspecto aserrado en estas primeras horas (alrededor de 6 hpa) que luego se perderá al cerrarse estas depresiones o huecos (entre 6 y 12 hpa) (Jazwinska et al., 2007). Esta etapa inicial es independiente de la proliferación celular. A este primer epitelio de la herida se van a unir más capas epiteliales para dar lugar a la epidermis de la herida o capuchón epidérmico apical (AEC). Este AEC se cree que va a tener un papel similar al de la cresta ectodérmica apical (AER) durante el desarrollo de las extremidades, secretando factores que promuevan y regulen el proceso regenerativo.

(ii) Formación del blastema (Figura 3C). Ocurre entre las 12 y las 48 hpa.

El blastema es un conjunto de células proliferativas e indiferenciadas que se encuentra por debajo de la epidermis de la herida y que provienen de células mesenquimales próximas al plano de amputación. El blastema se caracteriza por la expresión de 2 genes *msx* (*msxB* y *msxC*), que son represores transcripcionales y serán los responsables de mantener un estado dediferenciado y pluripotencial (Akimenko et al., 1995; Akimenko et al., 2003)(Figura 3B).

(iii) Crecimiento regenerativo. Es la fase final del proceso. Comienza a las 36-48 hpa y tiene lugar hasta que se completa la regeneración (Figura 3C). En este fase se repondrá la estructura que se había perdido. El blastema se subdivide en una parte distal y otra proximal con características morfológicas y moleculares diferentes. El blastema distal está compuesto por células de proliferación lenta

que expresan *msxB* y *msxC* y se comportan como células progenitoras, mientras que el blastema proximal es de proliferación rápida y será el que conduzca al crecimiento regenerativo (Akimenko et al., 2003; Nechiporuk et al., 2003)(Figura 3B).

2.2 Restricción de linaje durante la regeneración de la aleta

Hasta hace poco tiempo no se sabía si el blastema estaba formado por diferentes tipos de células progenitoras aportadas por los distintos tejidos de la aleta y con linaje restringido, o si por el contrario provenían de un único tipo celular que podía dar lugar a todos los

demás. Dos trabajos recientes en los que se han empleado distintos métodos de marcaje para seguir el destino de las células de la aleta después de la amputación, sugieren que existe restricción de linaje durante la regeneración (Knopf et al., 2011; Tu and Johnson, 2011). Mediante el análisis de clones basados en la inserción mediada por un transposón del gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control de un promotor de expresión ubicua, se han identificado los linajes que participan en la formación de la aleta adulta. Estos linajes independientes son : 1) endotelio arterial y venoso; 2) osteoblastos; 3) fibroblastos; 4) glia; 5) melanóforos y xantóforos; 6) iridóforos; 7) epidermis, 8) línea lateral y 9) sangre residente (Tu and Johnson, 2011). Estos nueve linajes ya

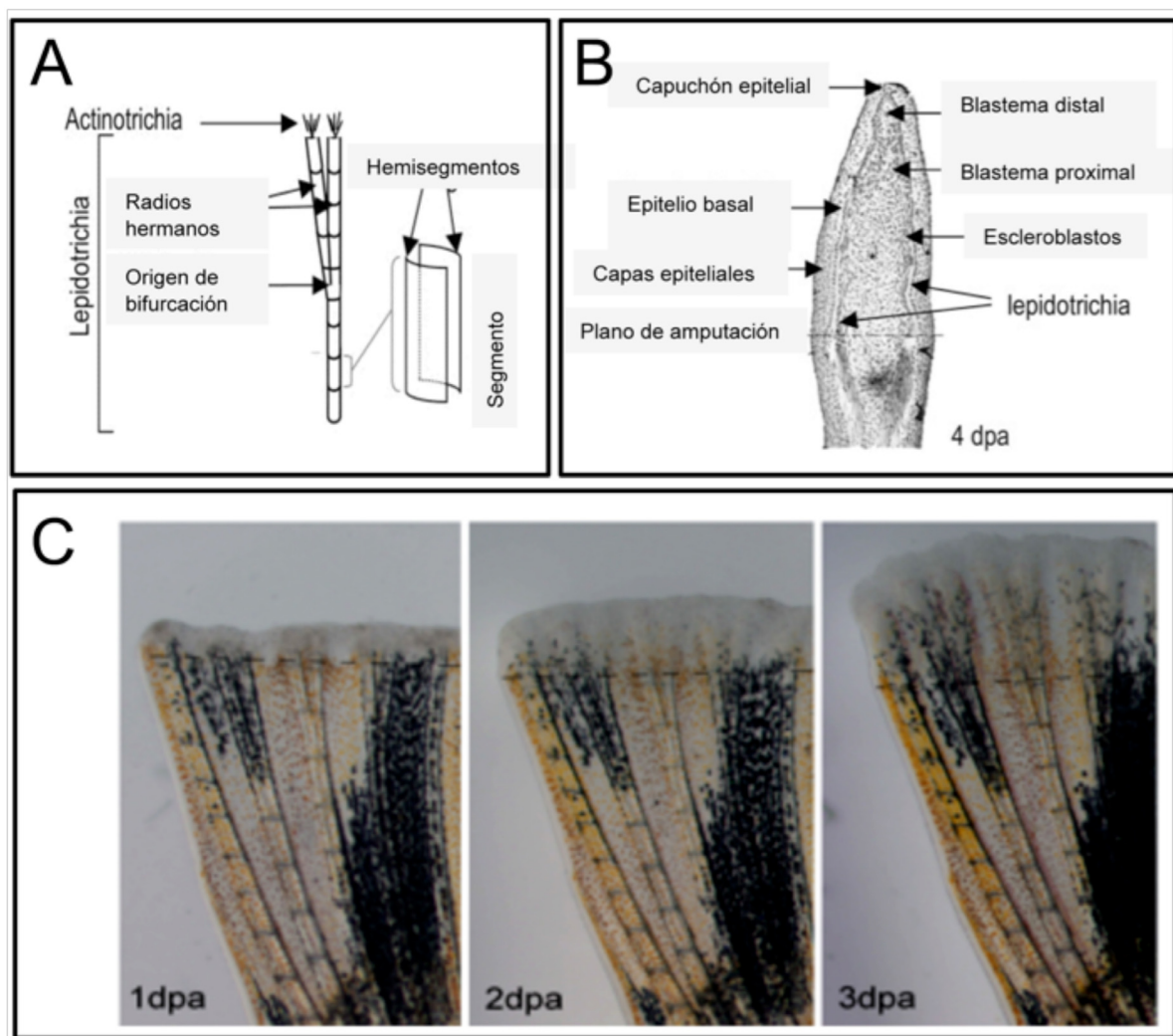


Figura 3. La aleta del pez cebra durante la regeneración.

(A) Estructura de los radios de la aleta

(B) Sección histológica de una aleta a 4 días tras la amputación

(C) Aleta en las distintas fases del proceso regenerativo : cierre de la herida (1dpa), formación del blastema (2dpa) y crecimiento regenerativo (3dpa).).

están especificados en el primordio de la aleta entre los 2 y los 12 días tras la fertilización del huevo (Tu and Johnson, 2011).. Las células de un linaje regeneradas son hijas de otras del mismo linaje y no se dan procesos de transdiferenciación (Tu and Johnson, 2011). Es más, también descartan la contribución de células madre circulantes ya que analizan 150 peces que llevan distintos clones en el cuerpo pero no en la aleta y ninguno de estos clones al cortarle la aleta contribuye a su regeneración (Tu and Johnson, 2011). Así pues en la regeneración de la aleta existe restricción de linaje y una célula del blastema, contrariamente a lo que se creían anteriormente, no es pluripotente ni capaz de dar lugar a cualquiera de los tipos celulares que conforma la aleta.

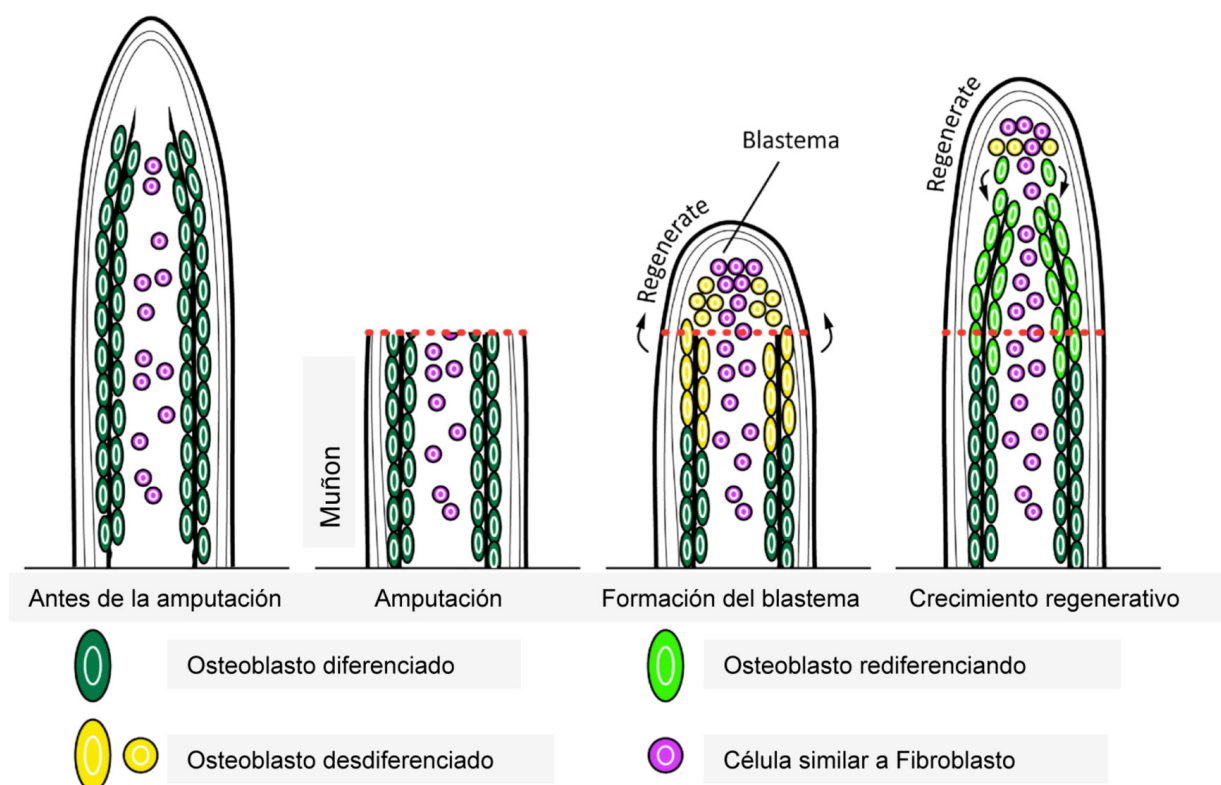
La restricción de linaje durante la regeneración de las extremidades parece que es una característica compartida entre los vertebrados ya que además de en peces se ha visto que ocurre en anfibios (en la extremidad de axolote (Kragl et al., 2009) y en la cola de *Xenopus* (Gargioli and Slack, 2004)) y recientemente también en la regeneración de la falange distal de las extremidades de ratones (Rinkevich et al., 2011). También es destacable el hecho de que al igual que en pez cebra, durante la regeneración de la falange distal de ratones se ha visto que no hay ninguna contribución de células circulantes de ningún tipo ni a ningún tejido, y que la regeneración por tanto es debida a fuentes celulares locales (Rinkevich et al., 2011).

2.3 De-diferenciación durante la regeneración de la aleta

En un trabajo reciente en el que se ha utilizado la tecnología Cre/loxP para trazar los linajes celulares de la aleta en regeneración se ha demostrado que durante este proceso, al menos el linaje osteoblástico proviene de la dediferenciación de células maduras que entran en el blastema, que después de proliferar, van a rediferenciarse de nuevo en osteoblastos (Knopf et al., 2011) (Figura 4). Al comienzo

de la regeneración de la aleta se produce un descenso en la expresión de *Osterix* (marcador de osteoblastos intermedios) y de *Osteocalcina* (marcador de osteoblastos maduros) en los osteoblastos cercanos al plano de amputación, así como un aumento en la expresión de *Runx2*, que es un factor de transcripción que se expresa en precursores de osteoblastos (Knopf et al., 2011). Estos mismos marcadores se expresan de manera secuencial (*Runx2*, *Osterix* y *Osteocalcin*) durante el desarrollo del hueso de los radios de la aleta caudal y de la cabeza, y se vuelven a expresar en la misma secuencia temporal durante la regeneración de la aleta en la zona de crecimiento donde se está formando de nuevo hueso. Otro trabajo reciente describe que durante la regeneración de la aleta se produce un aumento en la expresión de *Sox9a* (marcador de esqueletogénesis temprano) a 12hpa por debajo del plano de amputación y posteriormente hasta las 72hpa, también en la región por encima del plano de amputación (Sousa et al.). En este mismo trabajo se observa un aumento en la expresión de *osterix*, *colla2* y *coll10a1* (marcadores de esqueletogénesis intermedia, estadio de deposición de matriz de hueso) a partir de 24 hpa que se mantiene al menos hasta pasadas las 72 hpa, y de osteocalcin y osteonectin (ambos marcadores de diferenciación tardía implicados en mineralización) débilmente a partir de 24hpa y más claramente a partir de 48hpa y hasta más allá de las 72 hpa (Sousa et al.). Estos resultados en principio contradictorios se explican por las distintas aproximaciones seguidas para analizar la expresión de los marcadores; en un trabajo se utilizan animales transgénicos con un reportero GFP (Knopf et al., 2011) y en el otro se miden los niveles de expresión directamente mediante hibridación in situ (Sousa et al.).

Se ha visto que los osteoblastos maduros que están por debajo del plano de amputación empiezan a perder su morfología diferenciada (con núcleos alargados y rodeados de matriz extracelular) para adquirir una morfología típica de osteoblastos indiferenciados o no maduros (núcleos redondeados, mayor matriz extracelular y un gran retículo endoplásmico) a la vez que dejan de expresar *osteocalcina* y



Modificada de (Knopf et al., 2011)

Figura 4. Modelo de regeneración del hueso de la aleta.

Tras 24 hpa, los osteoblastos maduros más próximos al plano de amputación comienzan a de-diferenciarse y migran hacia el blastema. Estos osteoblastos de-diferenciados van a proliferar y posteriormente se rediferenciarán para formar parte única y exclusivamente del nuevo hueso (Knopf et al., 2011).

empiezan a proliferar (Knopf et al., 2011). Esta proliferación, al menos en parte está regulada por señalización a través de Fgfs (Knopf et al., 2011). Estas células que han proliferado y que se encuentran por debajo del plano de amputación, migran hacia el blastema y pasan a formar parte de él (Knopf et al., 2011; Sousa et al.). Una vez en el blastema, estas células van a rediferenciarse y a dar lugar de nuevo a osteoblastos para formar el hueso (Figura 4). Además, en este mismo trabajo (Knopf et al., 2011), se ha comprobado mediante estudios de trazados de linaje que las células que expresan *osterix* (los osteoblastos) solo son capaces de dar lugar a osteoblastos, es decir, que tal y como se ha visto en otros trabajos (Gargioli and Slack, 2004; Kragl et al., 2009; Tu and Johnson, 2011), existe restricción de linaje durante la regeneración del hueso.

Se han identificado múltiples vías de señalización intercelular implicadas en la regeneración de la aleta, pero sólo para algunas se han llevado a cabo estudios funcionales de pérdida y ganancia de función con objeto de determinar su papel durante este proceso. Entre las vías mejor conocidas están la del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); quimioquinas como el factor de crecimiento de células del estroma1 (Sdf-1); las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y activina pertenecientes a la super-familia del factor de crecimiento transformante beta (TGFβ); Wnt/β-catenina, la vía del ácido retinoico (RA); del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF); el factor de crecimiento insulínico (IGF) y la señalización por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Bayliss et al., 2006; Chablais and Jazwinska, 2010; Dufourcq and Vríz, 2006; Geraudie et al., 1995; Jazwinska et al., 2007; Niethammer et al., 2009; Poss et al., 2000b; Quint et al., 2002; Stoick-Cooper et al., 2007b) (**Figura 5**).

2.4 Señalización durante la regeneración de la aleta

2.4.1 Señalización temprana para la detección del daño: implicación de H_2O_2

La señalización a través de H_2O_2 ha sido estudiada principalmente durante la regeneración del primordio de la aleta en larvas de pez cebra (Niethammer et al., 2009; Rieger and Sagasti, 2011). La concentración de H_2O_2 comienza a aumentar muy rápidamente tras la amputación, a los 3 minutos, y alcanza su pico de máxima concentración en 20 minutos tras la amputación (Niethammer et al., 2009). La oxidasa dual (Duox) de las células epiteliales genera un gradiente decreciente desde el plano de amputación, que se extiende unas 200 μm en el epitelio de la cola de la larva. Este gradiente es indispensable para el reclutamiento de leucocitos a la herida y tanto el reclutamiento como la formación del gradiente, se inhiben con la inyección de un morfolino (MO, ver Materiales y Métodos) para duox (Niethammer et al., 2009). El gradiente, además de sus funciones antisépticas y de reclutamiento de leucocitos, se requiere para la regeneración de los axones somatosensoriales periféricos que inervan la piel (Rieger and Sagasti, 2011). La inhibición del aumento de la concentración de H_2O_2 hace que no se regeneren los axones mientras que el aumento artificial o la ablación de algún keratinocito, el tipo celular responsable de la generación del gradiente, en cualquier parte del cuerpo promueve un sobrecrecimiento (Rieger and Sagasti, 2011). Aunque todos estos estudios se han llevado a cabo en el modelo de amputación del primordio de la cola en larvas de pez cebra, cabría esperar que el H_2O_2 también jugara un papel importante durante la regeneración de la aleta en adultos.

2.4.2 La formación de la epidermis de la herida: participación de Activina β A y de IGF

La super familia de transforming growth factor beta TGF β s activada durante la regeneración de la aleta. Activina β A, alk4 y varios miembros de las proteínas morfogenéticas del hueso se expresan tras la amputación y tienen un papel importante durante el proceso (Jazwinska et al., 2007; Laforest et al., 1998; Quint et al., 2002; Smith et al., 2006) (Figura 5). Activina β A es

un ligando secretado que señala a través de receptores serina-treonina kinasa como alk4 y comienza a expresarse 1 hpa en células mesenquimales de la zona interrredial (Jazwinska et al., 2007) USA. ajazwinska@enders.tch.harvard.edu Activin interviene en el proceso de cierre de la herida tras el retraimiento de la epidermis de la zona interrredial y su inhibición farmacológica bloquea la regeneración, y hace que la aleta se quede con una forma irregular (Jazwinska et al., 2007) (Figura 6). Activin también está implicada en el mantenimiento y la proliferación del blastema y su inhibición farmacológica o mediante la inyección y electroporación de un morfolino (MO) dirigido contra su mensajero bloquea el proceso y hace que se pierda la expresión de *msxB* (Jazwinska et al., 2007). La inyección y electroporación de MOs es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para demostrar la implicación funcional de genes en la regeneración de la aleta caudal en el pez cebra (Bouzafeffour et al., 2009; Chablais and Jazwinska, 2010; Hoptak-Solga et al., 2008; Jazwinska et al., 2007; Kizil et al., 2009; Rojas-Munoz et al., 2009; Thatcher et al., 2008; Thummel et al., 2006; Thummel et al., 2007; Yin et al., 2008). Tras amputar la aleta se deja que regenere 1 ó 2 días y posteriormente se inyecta el MO en la mitad dorsal o ventral de la aleta en regeneración, de forma que la otra mitad queda como control interno. Posteriormente, se electropora la aleta entera, se deja a los peces regenerar y se vuelve a mirar 2 días después para ver si existen diferencias entre la mitad inyectada con el morfolino y la mitad control.

IGF juega un papel importante en las primeras fases de la regeneración (señalizando desde la zona del blastema al epitelio de la herida para que este se forme correctamente) (Chablais and Jazwinska, 2010). El ligando igf2b se expresa a partir de 8 hpa en la zona del blastema de los radios y provoca la fosforilación y activación del receptor Igf1r por todo el epitelio de la herida (Chablais and Jazwinska, 2010). La inhibición farmacológica da como resultado el bloqueo del proceso y la inyección de MO dirigidos contra Igf2b, Igf-1ra y Igf-1rb también afecta al proceso (Chablais and Jazwinska, 2010) (Figura 6). La

pérdida de señalización a través de IGF hace que no se forme la capa basal del epitelio de la herida y que haya un mayor número de células en apoptosis. Esto provoca que haya menos proliferación en el blastema y que éste no exprese marcadores o genes implicados en su formación y mantenimiento como *fgf20a*, *wnt5b*, *lef1* y *msxb* (Chablais and Jazwinska, 2010).

2.4.3 Señalización por FGFs en el cierre de la herida, formación del blastema y crecimiento regenerativo

Una de las vías mejor conocidas y caracterizadas en la regeneración de la aleta es la de FGF. El receptor *fgfr1* se expresa a partir de 12 hpa en la zona que va a dar lugar al blastema,

y la inhibición farmacológica temprana de la vía impide que se produzca la regeneración (Poss et al., 2000b). La inhibición farmacológica o la inyección de un MO después de que se haya establecido el blastema también da lugar a una inhibición del proceso y una reducción en la expresión de los marcadores de blastema *msxB* y *msxC* (Poss et al., 2000b; Thummel et al., 2006) (Figura 6). Los mismos resultados se obtienen al expresar la versión dominante negativa del receptor *fgfr1* (Lee et al., 2005).

El ligando responsable de la señalización es *fgf20a*, como se desprende del hecho de que el mutante sensible a temperatura para este gen no sea capaz de regenerar la aleta (Whitehead et al., 2005). *Fgf20a* comienza a expresarse muy tempranamente (6 hpa) en la zona limítrofe entre

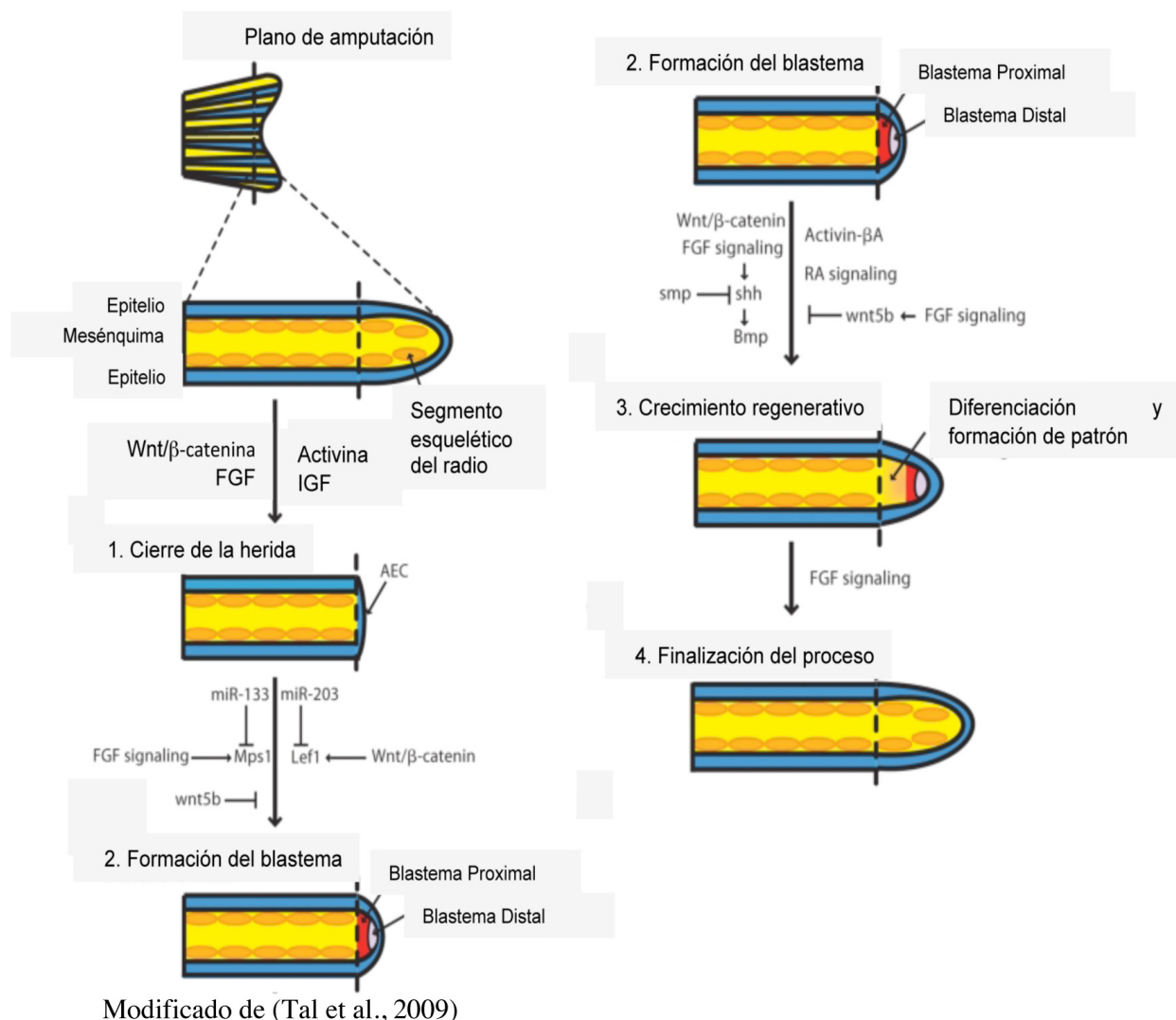


Figura 5. Esquema de los eventos de señalización más importantes que tienen lugar en cada una de las fases de la regeneración.

el epitelio y el mesénquima, y su inactivación da lugar a la aparición de un epitelio regenerativo defectuoso y a que no se forme el blastema, implicándolo de esta manera también en las dos primeras fases de la regeneración (Whitehead et al., 2005) (Figura 6). También se expresan durante la regeneración distintos genes diana Fgf (Lee et al., 2005; Lee et al., 2009). Se ha visto que Fgf no interviene en la de-diferenciación de los osteoblastos pero si en su proliferación (Knopf et al., 2011).

Fgf regula directamente la proliferación inhibiendo la acción del microARN mir133 (Yin et al., 2008). Los micro ARN son pequeños ARNs no codificantes con secuencias complementarias a las de la región 3'- no transcribibles de ARNs codificantes a las que se unen para impedir su transcripción o promover su degradación (Kloosterman and Plasterk, 2006). Se ha demostrado que la acción de los microARN es indispensable para que la regeneración tenga lugar y que la expresión de muchos de ellos aumenta o disminuye durante el proceso regenerativo (Thatcher et al., 2008; Yin et al., 2008). Fgf disminuye la expresión de mir133 impidiendo que éste inhiba la proliferación mediante la represión de la transcripción de *mps1*, que codifica para una quina de punto de control mitótico, indispensable para la proliferación (Poss et al., 2002a; Yin et al., 2008) (Figura 6).

Fgf también crea un gradiente decreciente en sentido caudal que es responsable de las diferencias en la tasa de crecimiento dependiendo de la posición (Lee et al., 2005). Cuanta más caudal es el plano de amputación menor es la cantidad o el dominio de expresión de FGF y de sus genes diana y menor la tasa de proliferación (Lee et al., 2005). Además se ha visto que Fgf controla la regeneración homeostática de la aleta (Wills et al., 2008b). Por regeneración homeostática se entiende al reemplazamiento regular de células perdidas por apoptosis, envejecimiento y desgaste diario sin que medie una herida. En condiciones normales existe apoptosis y proliferación por toda la aleta, sobre todo en la parte distal (Wills et al., 2008b). La inhibición de Fgf o de *mps1*

(su expresión está regulada por FGF) durante largos periodos de tiempo da como resultado la pérdida progresiva de tejido en la aleta y la aparición de malformaciones en las uniones intersegmentales de los radios (Wills et al., 2008b). El restablecimiento de la señalización después de estos periodos da como resultado un aumento en proliferación y la expresión de genes diana de la vía (*mkip3*) y marcadores de regeneración (*msxb*), que también se expresan en pequeña concentración en condiciones normales (Wills et al., 2008b).

2.4.4 La Señalización a través de Wnt se requiere en todas las fases del proceso regenerativo

Otra de las vías involucradas en la regeneración de la aleta y que intervienen al igual que Fgf en todas las fases del proceso, es Wnt (Stoick-Cooper et al., 2007b). Los Wnt son ligandos glicoproteicos secretados que se unen a receptores de la familia de Frizzled para activar la señalización canónica a través de β -catenina o la no canónica que es independiente de β -catenina (Rao and Kuhl, 2010). Ambas están implicadas en la regeneración y juegan papeles opuestos (Stoick-Cooper et al., 2007b). La vía canónica promueve la regeneración y la no canónica, la inhibe (Figura 6). Además la vía canónica promueve la expresión de la no canónica, existiendo un circuito de retroalimentación (Kawakami et al., 2006; Lee et al., 2009; Stoick-Cooper et al., 2007b).

El ligando *wnt10a*, el efector y activador *lef1* y los genes diana *axin2* y *sp8* de la vía canónica se expresan durante la regeneración (Poss et al., 2000a; Stoick-Cooper et al., 2007b). También lo hacen los ligandos *wnt5a* y *wnt5b* de la vía no canónica (Stoick-Cooper et al., 2007b). Mediante la expresión controlada de un inhibidor secretado de la vía dependiente canónica de Wnt, se ha visto que la señalización Wnt/ β -catenina está implicada en las tres fases de la regeneración: cierre de la herida, formación del blastema y crecimiento regenerativo (Stoick-Cooper et al., 2007b) (Figura 5 y Figura 6). Su inhibición provoca una disminución de la proliferación de las células del epitelio y del mesénquima y la desaparición

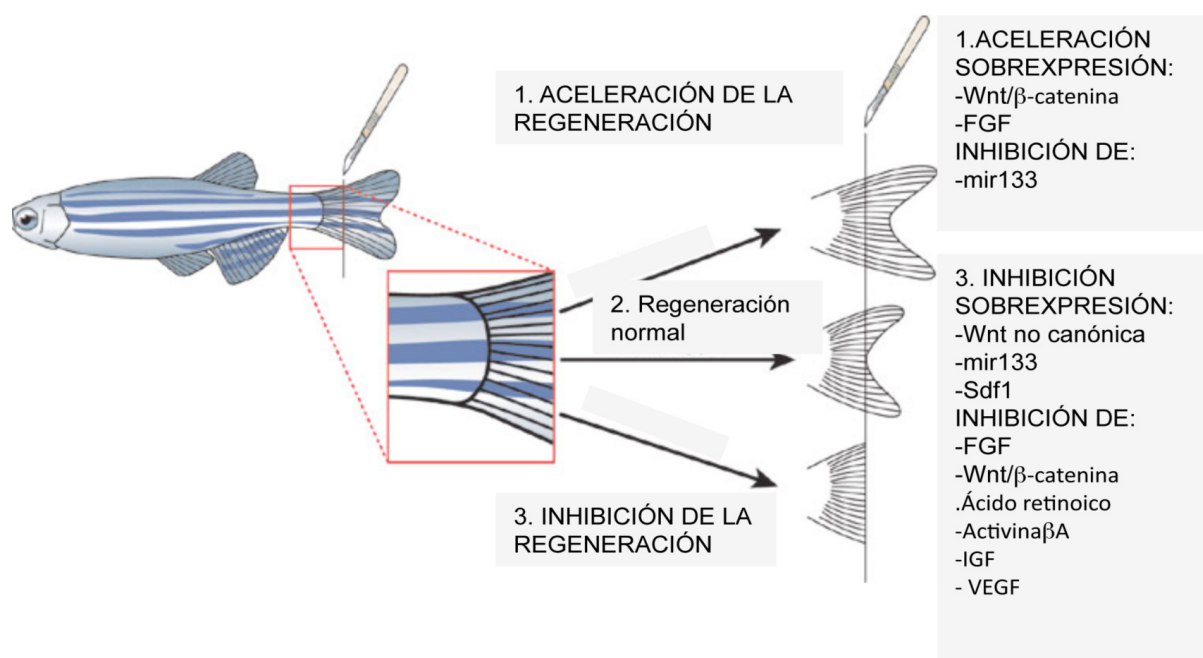
de los marcadores del blastema. Además la sobre-expresión de la vía canónica resulta en un aumento en la proliferación mientras que peces mutantes heterocigotos para *axin1*, un inhibidor de la vía canónica, regeneran más rápido (Stoick-Cooper et al., 2007b) Institute for Stem Cell and Regenerative M. De la misma manera, la inhibición de la traducción de *lef1* inhibe la regeneración, mientras que la sobre-expresión hace que se acelere (Thatcher et al., 2008)e. Además se ha demostrado que la expresión inicial de *fgf20a* está regulada por Wnt/ β -catenina (Stoick-Cooper et al., 2007b).

Por otra parte, durante la regeneración de la aleta se induce la expresión de *wnt5a* y *wnt5b*, ligandos de la vía no canónica. Estos se expresan en la epidermis distal con un patrón de expresión muy parecido (Stoick-Cooper et al., 2007b). La sobre-expresión de *wnt5b* inhibe la regeneración si se induce antes del comienzo del proceso, o que haya menos proliferación si se induce una vez establecido el blastema. Por el contrario, la regeneración es más rápida en peces mutantes homocigotos para este gen (Stoick-Cooper et al., 2007b)(Figura 5 y Figura

6).

2.4.5 Integración de señales Fgf y Wnt en la epidermis

La integración de señales de las vías canónica y no canónica de Wnt junto con Fgf, da lugar a la generación de dominios epidermicos funcionalmente distintos y que explican cómo se mantiene la proliferación en el blastema adyacente (Lee et al., 2009). La epidermis distal se caracteriza por la expresión de *wnt5b* y de *pea3* y la proximal por la de *lef1* y Sonic hedgehog (*shh*) (Lee et al., 2009). *Shh* es un morfógeno que promueve la proliferación del blastema y la formación de patrón de los escleroblastos (Laforest et al., 1998; Quint et al., 2002) (Figura 5 y Figura 6). *Fgfva* a mantener la expresión de *shh* y de *lef1* en la zona proximal y en la distal la de *wnt5b* con la participación de *v-ras* (Lee et al., 2009). A su vez, *wnt5b* desde la zona distal inhibe la de *shh* y *lef1*, creando así un espacio restringido donde se permite la proliferación (Lee et al., 2009). Al mismo tiempo, la traducción de *lef1*



Modificado de (Zon, 2008)

Figura 6. Consecuencias de la manipulación de algunas vías de señalización en la regeneración de la aleta caudal en el pez cebra.

La manipulación de distintas vías, ya sea farmacológicamente, mediante la inyección de morfolinós, cDNA, antagonistas o en modelos genéticos (de ganancia o falta de función) da como resultado la aceleración o el bloqueo de la regeneración y puede afectar a una o varias fases del proceso.

está regulada por el microARN mir203 que va a inhibirla siendo un segundo freno para parar la regeneración (Thatcher et al., 2008).

2.4.6 Las quimioquinas forman un segundo bucle de retroalimentación para regular la regeneración de la aleta

También se ha descrito la participación y señalización de quimioquinas durante la regeneración y en particular, en relación con Fgf y Wnt (Bouzaffour et al., 2009; Dufourcq and Vríz, 2006). Durante la regeneración se induce la expresión de los factores 1a y 1b derivado de célula estromal (*sdf1a* y *sdf1b*) en la zona del blastema y la de los receptores *cxcr4a*, *cxcr4b* y *cxcr7* en la epidermis de la herida (Bouzaffour et al., 2009; Dufourcq and Vríz, 2006). Fgf20a promueve la expresión de todos ellos y *sdf1* va a inhibir la regeneración mediante la inhibición de la transcripción de Fgf20a creando así un segundo bucle de retroalimentación para regular el proceso (Bouzaffour et al., 2009). Aunque parece que las quimioquinas van a tener simplemente una función reguladora ya que el mutante homocigoto de pérdida de función de *sdf1* regenera, aunque más lentamente (Bouzaffour et al., 2009).

2.4.7 La señalización por ácido retinoico Se requiere para el cierre de la herida, la formación y mantenimiento del blastema y la formación de hueso.

Una de las primeras vías de señalización para las que se describió su implicación en la regeneración de la aleta fue la del ácido retinoico (Geraudie et al., 1995; White et al., 1994). El ácido retinoico (RA) se obtiene de la vitamina A gracias a una conversión metabólica, y es un importante transductor de señales que se une al receptor nuclear de hormonas (Duester, 2008; Maden, 2002, 2007; Maden and Hind, 2003). RA está implicado en numerosos procesos durante el desarrollo y también está demostrada su implicación en la regeneración de la extremidad en vertebrados (Duester, 2008; Maden, 1982; Maden and Hind, 2003). Durante la regeneración de la aleta, RA está implicado en la formación de patrón (Laforest

et al., 1998; White et al., 1994). Si se añade RA exógeno provoca un retraso en la formación o deposición de hueso mediante la inhibición de la transcripción de Shh (Laforest et al., 1998; White et al., 1994)(Figura 5 y Figura 6). Recientemente se ha demostrado que también participa en las fases de cierre de la herida y de formación del blastema (Blum and Begemann, 2012; Mathew et al., 2009) y su falta de función conlleva la inhibición de la regeneración tanto en larvas (Mathew et al., 2009) como en adultos (Blum and Begemann, 2012). La expresión de retinol aldehído deshidrogenasa (*raldh2*, la enzima que cataliza el paso final para dar lugar a RA) es crítica para la formación del blastema (Blum and Begemann, 2012; Mathew et al., 2009). La expresión de *raldh2* durante la regeneración en larvas está regulada por Wnt/ β -catenina y por FGF y Erk1/2 (Mathew et al., 2009). Erk1/2 es una quinasa celular que es fosforilada y activada por FGF (Mathew et al., 2009). Durante la regeneración en adultos *raldh2* se expresa a partir de 6 hpa en el mesénquima de los radios y de los interradios más proximal al plano de amputación (Blum and Begemann, 2012). Durante la formación del blastema se requiere para la expresión de *fgf20a* y promueve la inducción de *wnt10a* (Blum and Begemann, 2012). Su inhibición en esta fase bloquea la entrada de las células precursoras del blastema en el ciclo celular y la adición de RA exógeno es suficiente para promover la proliferación del blastema (Blum and Begemann, 2012). De la misma manera se requiere RA una vez establecido el blastema para su mantenimiento, mediante la inhibición de la apoptosis, y para la regulación de su proliferación (Blum and Begemann, 2012). La inhibición de RA durante esta fase tiene como resultado la muerte por apoptosis del tejido regenerado/ en regeneración (Blum and Begemann, 2012).

2.4.8 La señalización por Bmp en la formación de hueso durante el crecimiento regenerativo.

Dentro de la superfamilia de Tgf β , distintas Bmps están implicadas en la regeneración de la aleta. (Laforest et al.,

1998; Quint et al., 2002; Smith et al., 2006). Bmp2b, Bmp4 y Bmp6 se expresan durante el proceso y promueven la deposición de hueso, la proliferación y la formación de patrón durante la última fase de la regeneración (Laforest et al., 1998; Quint et al., 2002; Smith et al., 2006). Mediante la inyección de Chordin, un inhibidor de BMP, a 4dpa se ha demostrado que Bmp regula la expresión de *runx2a*, *runx2b*, *col10a1*, *col2a1* y *sox9a* (Smith et al., 2006), lo que apunta a que los BMP están involucrados en la de-diferenciación y posterior re-diferenciación de los osteoblastos para regenerar el hueso al menos durante esta fase (Knopf et al., 2011; Smith et al., 2006; Sousa et al., 2011). La inyección de este mismo inhibidor rescata los defectos en la formación de patrón producidos por una sobre-expresión de *shh* y la expresión de *shh* no se ve afectada al inhibir Bmp, lo que indica que están regulados en esta fase por *shh* (Smith et al., 2006).

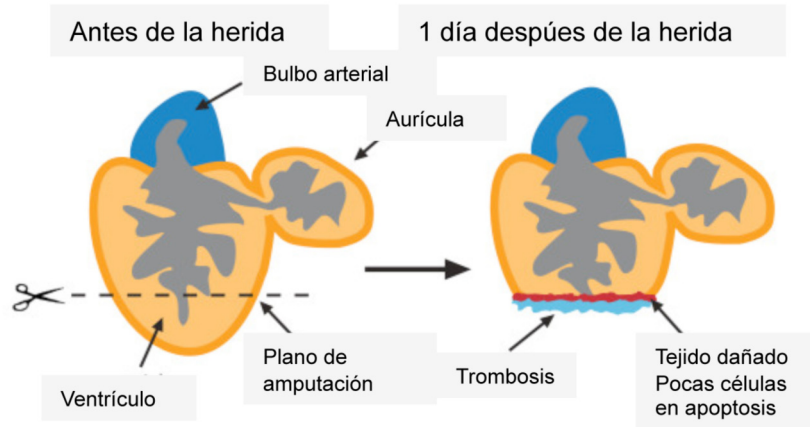
2.4.9 La angiogénesis y el papel de VEGF en la regeneración de la aleta.

Otra de las vías de señalización implicadas en la regeneración es la del factor de crecimiento del endotelio vascular (Vegf). Vegf tienen un papel permisivo, ya que no promueve directamente la regeneración, pero su acción se requiere para que pueda tener lugar, ya que el riego sanguíneo a la zona en regeneración es indispensable para que esta se produzca (Bayliss et al., 2006). En ausencia de angiogénesis la aleta comienza a regenerarse pero el crecimiento se para al alcanzar unos 800 μm , presumiblemente porque más allá de esta distancia, los nutrientes no pueden llegar por difusión a las células (Bayliss et al., 2006). La angiogénesis está mediada por la señalización a través Vegf (Figura 5 y Figura 6). Son responsables de la inducción de la angiogénesis los ligandos *vegfa* y *vegfc* y el receptor *vegfr2* (Bayliss et al., 2006; Khatib et al., 2010). Vegf-c tiene que ser procesado por las convertasas furin y pc5, que también aumentan su expresión durante la regeneración, y la acumulación de proVegf-C (no procesado) tiene un efecto inhibitorio sobre la regeneración (Khatib et al., 2010).

3. REGENERACIÓN DEL CORAZÓN EN EL PEZ CEBRA

Además de regenerar las aletas, el pez cebra tiene la capacidad de regenerar el corazón después de haber sufrido una amputación de hasta el 20% del ventrículo, en aproximadamente 60 días (Poss et al., 2002b). El corazón del pez cebra se encuentra en una posición antero-ventral con respecto a la cavidad torácica dentro del saco pericárdico (Hu et al., 2001). Es un corazón bicameral, formado por una aurícula y un ventrículo. La primera recoge la sangre que llega del cuerpo y está situada en la zona dorsal del ventrículo, que tiene forma piramidal (Figura 2C). El ventrículo bombea la sangre hacia la zona anterior del cuerpo a través del bulbo arterioso, una estructura con forma de pera y formada en gran parte por músculo liso, que se interpone entre el ventrículo y la aorta ventral (Hu et al., 2001). El ventrículo está recubierto externamente por el epicardio e internamente por el endocardio. Entre ambos, se disponen las trabéculas musculares, que se expanden por el interior formando una red esponjosa y llenándolo casi enteramente. La trabeculación sigue un patrón similar a aquél que encontramos en el pollo y es esencial para la generación de una fuerza de bombeo y una contracción, mecánica y energéticamente eficientes (Hu et al., 2001). Las trabéculas son estructuras relativamente largas, radiales, con menos ramificaciones y menos organizadas que las de los vertebrados superiores. Dentro del ventrículo existe también una zona de miocardio compacto no trabecular situada en la periferia, en contacto con el epicardio y que es comparativamente más delgada que de vertebrados superiores (Hu et al., 2001).

El corazón adulto del pez cebra es muy parecido anatómicamente al corazón embrionario de mamíferos antes de la formación del septo. Al contrario de los cardiomiocitos de mamíferos que salen del ciclo celular y pasan a ser binucleados (ratón)



Modificada de (Chablais et al., 2011)

Figura 7. Modelo de amputación del ápice del ventrículo en el pez cebra.

Tras hacerse una incisión en la cavidad torácica y el pericardio para acceder al corazón se amputa el ápice del ventrículo. La zona amputada representa alrededor del 15% y resulta en una pérdida de sangre importante. Un día después de haberse producido se observa un coágulo eritrocítico y algunas células en apoptosis en la zona dañada cercana al plano de amputación.

o poliploides (humanos), los cardiomiocitos de pez cebra son pequeños, mononucleados (y diploides) y mantienen un elevado potencial proliferativo a lo largo de la vida (Laflamme and Murry, 2011; Porrello et al., 2011; Wills et al., 2008a). Recientemente y basándose en estas similitudes se examinó el potencial regenerativo del corazón de ratones neonatos, observándose que, al igual que en el pez cebra, es capaz de regenerar tras sufrir una amputación del 15% del ventrículo. Esta propiedad se mantiene sólo hasta 1 semana de edad (momento en que los cardiomiocitos reactivan el ciclo celular y pasar a ser binucleados) (Porrello et al., 2011).

3.1 El modelo de amputación del ápice del ventrículo

El modelo más ampliamente utilizado para estudiar la regeneración del corazón en el pez cebra es la resección o amputación del ápice del ventrículo. En este modelo, después de abrir la cavidad pectoral para acceder al saco pericárdico y al corazón, se amputa el ápice del ventrículo (alrededor del 15%) lo que produce un sangrado profuso que cesa a los pocos segundos, tras formarse un coágulo eritrocítico que taponar la herida (Poss et al., 2002b) (Figura 7). Este coágulo

será reemplazado a partir del segundo día tras la amputación (2dpa) por otro de fibrina que alcanza su tamaño máximo entre 7-9 dpa (Poss et al., 2002b).

La amputación desencadena en el corazón una respuesta dinámica que conlleva cambios tanto morfológicos, como en la expresión génica (Kikuchi et al., 2011b; Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006; Poss, 2010). Así, las células del endocardio, que se caracterizan por ser delgadas, estar estrechamente unidas a las miofibrillas y tener núcleos elongados, pasan a tomar una forma redondeada y parecen estar desunidas de las miofibrillas subyacentes (Kikuchi et al., 2011b). Estos cambios se observan tempranamente a 1 hpa, y tanto en zonas cercanas como distantes al plano de amputación. Mientras que la apariencia en las zonas más alejadas del tejido dañado vuelve a ser normal un día después de producirse la amputación, las diferencias morfológicas se aprecian hasta 7dpa cerca de la zona de amputación (Kikuchi et al., 2011b). Simultáneamente, se activa todo un programa de expresión génica tanto en el endocardio como en el epicardio que rodea las dos cámaras del corazón (Kikuchi et al., 2011b; Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006) (Figura 8). El epicardio migra a la vez que prolifera para cubrir el miocardio que ha

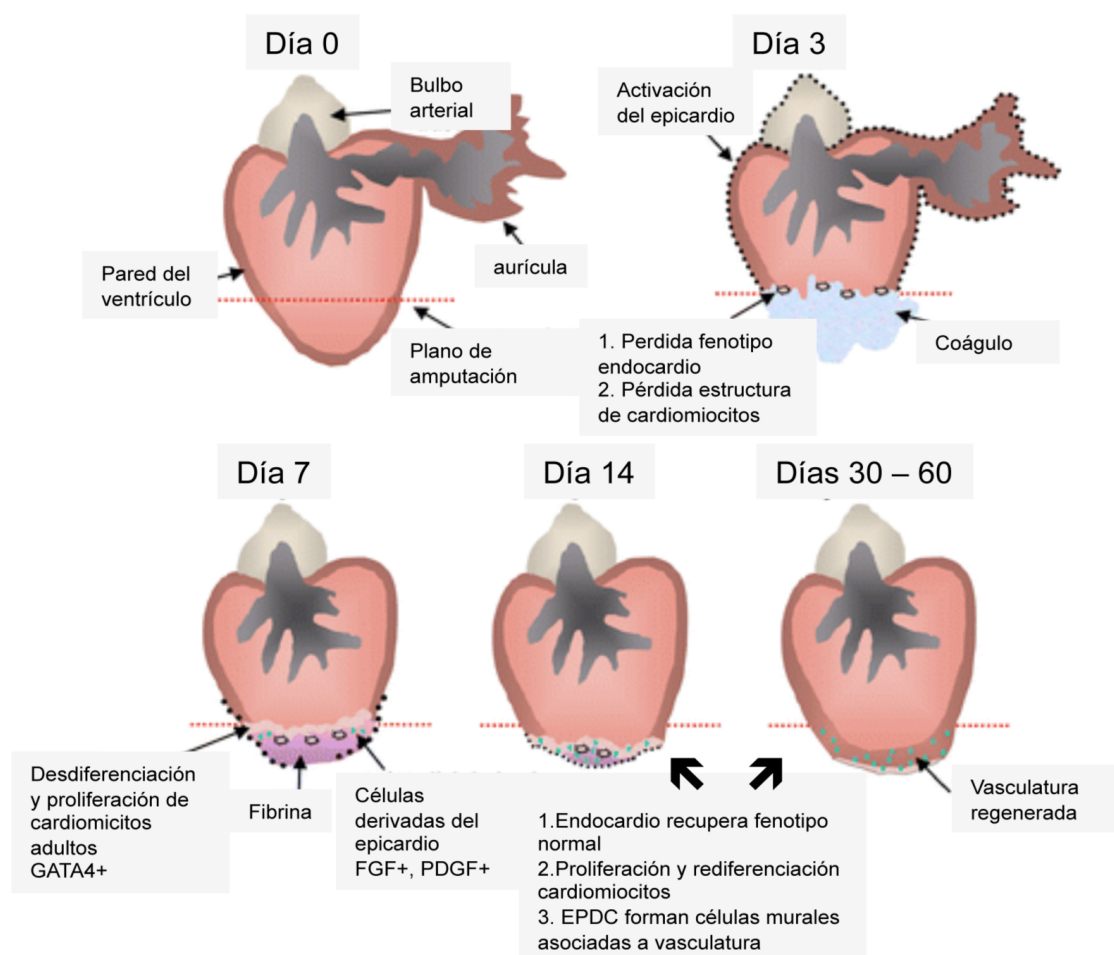
quedado expuesto debido a la amputación (Lepilina et al., 2006).

Entre los genes que se expresan en el epicardio durante la regeneración cardíaca encontramos genes implicados en el desarrollo, como son *wt1b*, *tbx18*, *tcf21* y *raldh2* (Kikuchi et al., 2011a; Lepilina et al., 2006; Schnabel et al., 2011). Todos ellos se re-expresan por todo el epicardio que rodea ambas cámaras del corazón a las pocas horas de producirse la amputación, y su expresión queda restringida a los 7 dpa a la zona de la herida donde se mantiene hasta la finalización del proceso (Kikuchi et al., 2011a; Lepilina et al., 2006; Schnabel et al., 2011). Durante el proceso regenerativo, una subpoblación

de células del epicardio sufre una transición epitelio mesénquima (TEM), el mesénquima generado invadirá la herida y dará lugar a las células perivasculares que forman parte de la nueva vasculatura de la zona regenerada (Kikuchi et al., 2011a; Lepilina et al., 2006; Wills et al., 2008a)(Figura 8).

3.2 De-diferenciación y restricción de linaje durante la regeneración del corazón

La regeneración en el corazón del pez cebra se produce a partir de la de-diferenciación y entrada en ciclo de



Modificada de (Lepilina et al., 2006).

Figura 8. Esquema de la regeneración del corazón tras sufrir una amputación con los eventos más importantes que tienen lugar durante el proceso.

Después de cesar la hemorragia, las tres capas del corazón se activan, experimentando cambios morfológicos y de expresión génica. El epicardio activado se expande y prolifera para cubrir la herida. Los cardiomiocitos cercanos al plano de amputación se de-diferencian y entran en proliferación para dar lugar a nuevos cardiomiocitos. Algunas células del epicardio sufren una TEM, migran e invaden la zona en regeneración y pasan a formar parte de la nueva vasculatura como células murales (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006).

cardiomiocitos adultos cercanos al plano de amputación (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). El miocardio del corazón en regeneración, al igual que el endocardio y el epicardio, sufre importantes cambios en su morfología y en su perfil de expresión génica. (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006; Lien et al., 2006; Sleep et al., 2010). Tras la amputación, los cardiomiocitos se desacoplan unos de otros, dejando grandes espacios intercelulares libres entre ellos, y al mismo tiempo se desorganizan los filamentos de actina y miosina, perdiéndose de esta manera la estructura de línea Z de los sarcómeros (Jopling et al., 2010). Además, disminuye la densidad de mitocondrias dentro de los cardiomiocitos y aparecen mitocondrias dismórficas (Kikuchi et al., 2010). La desorganización sarcomérica es máxima a los 7 dpa y afecta predominantemente a los cardiomiocitos que se encuentran cerca del plano de amputación (Jopling et al., 2010). Esta desorganización sarcomérica queda reflejada asimismo en una bajada en los niveles de expresión de genes de identidad sarcomérica (Lien et al., 2006; Sleep et al., 2010). Los cardiomiocitos que han perdido su estructura sarcomérica re-expresan genes implicados en desarrollo cardíaco y reinician el ciclo celular, para proliferar y dar lugar a los nuevos cardiomiocitos que regenerarán el tejido muscular perdido (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010) (Figura 8).

Al igual que el epicardio, el miocardio en regeneración expresa genes propios del desarrollo del corazón, como son *nkx2.5*, *hand2*, *tbx5*, *tbx20* y *gata4* (Lepilina et al., 2006). Dentro de ellos ocupa un lugar destacado *gata4*, que comienza a expresarse a partir de 3 dpa por todo el miocardio compacto del ventrículo, quedando su expresión restringida a la zona de la herida y a sus alrededores a los 14 dpa, y muy claramente a 30 dpa (Kikuchi et al., 2010). Mediante estudios de trazado de linaje utilizando líneas *Cre* inducibles por tamoxifeno, se ha observado que una gran parte de los cardiomiocitos que han expresado

gata4 contribuyen a la regeneración del tejido dañado (Kikuchi et al., 2010). De la misma manera, usando marcaje genético basado en tecnología *Cre/loxP*, se ha demostrado que casi la totalidad de los nuevos cardiomiocitos provienen de cardiomiocitos pre-existentes (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). Para ello se utilizaron dobles transgénicos que llevaban la recombinasa *Cre* inducible por tamoxifeno bajo el control del promotor de la cadena ligera de miosina cardíaca (*Tg(cmlc2:CreERT)*), y un cassette reportero en el que bajo un promotor específico de cardiomiocitos había una secuencia de parada de transcripción flanqueada por sitios *loxP* y seguida de la GFP (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). Mediante la adición de tamoxifeno durante el desarrollo embrionario (Jopling et al., 2010) o en el adulto (Kikuchi et al., 2010) justo antes de la amputación, se consiguió marcar específicamente los cardiomiocitos. Este tratamiento excinde la secuencia de parada gracias a la recombinación mediada por *Cre* y se expresa la GFP en cardiomiocitos embrionarios o adultos (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). Después de la amputación prácticamente la totalidad de los nuevos cardiomiocitos que han regenerado el corazón expresan GFP, lo que indica que provienen de cardiomiocitos preexistentes donde la recombinación había tenido lugar (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). Si vinieran de células madre o progenitoras no deberían expresar GFP.

Igualmente, mediante estudios de trazado de linaje, se ha descartado la posibilidad de que en condiciones normales durante la regeneración del corazón, el epicardio y las células derivadas de éste (EPDC) que invaden la zona de amputación, den lugar a nuevos cardiomiocitos (Kikuchi et al., 2011a).

3.3 Otros modelos

A pesar de los importantes descubrimientos llevados a cabo el modelo

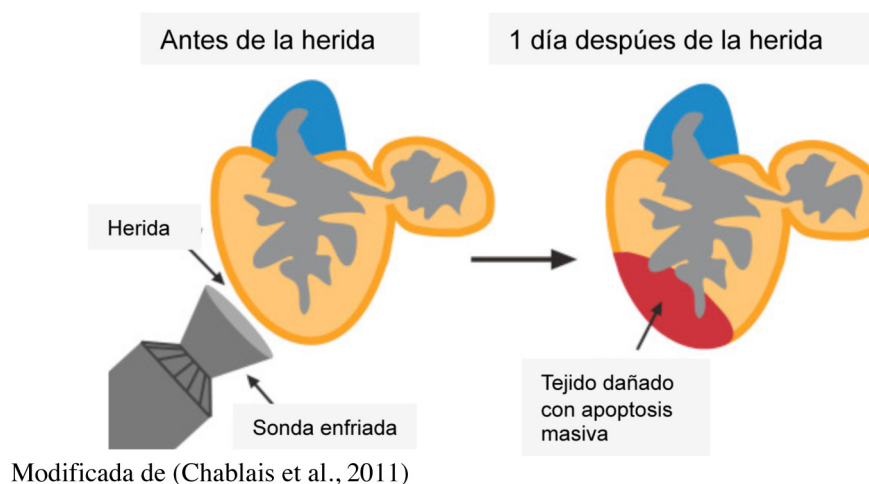


Figura 9. Modelo de crioinfarto en el pez cebra.

Tras hacer una incisión en la cavidad torácica y el pericardio para acceder al corazón se aproxima al corazón una sonda metálica que ha sido previamente enfriada en nitrógeno líquido. Al contrario que en el modelo de la amputación no se produce un sangrado, el área dañada y la supervivencia son mayores (25% frente al 15% y el 95% frente al 75% respectivamente). Un día después se observa una gran zona de tejido dañado con casi todas las células en apoptosis. Se forma una gran cicatriz de colágeno y fibrina que se elimina durante el proceso regenerativo (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011).

de amputación no refleja fielmente los procesos que pueden tener lugar tras un infarto de miocardio, debido a que en este proceso se produce una muerte celular masiva que da lugar a una gran zona necrosada que impide la correcta función cardíaca (Laflamme and Murry, 2011). Por esta razón, se han establecido otros dos modelos de regeneración cardíaca en el pez cebra que producen una gran muerte celular en el corazón y que reflejan de manera más fidedigna las lesiones asociadas al infarto de miocardio. En el primero modelo se induce la muerte celular de hasta un 25% del ventrículo mediante congelación con una sonda enfriada en nitrógeno líquido (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011)(Figura 9). En el segundo modelo, se induce la muerte celular de más del 60% de los cardiomiocitos gracias a la expresión inducida y controlada genéticamente de la toxina difterica (Wang et al., 2011). En los dos modelos, la pérdida de tejido es mayor que la producida con el modelo de amputación del ápice del ventrículo y ambos tienen como consecuencia la entrada de un altísimo número de células en apoptosis (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011; Wang et al.,

2011).

3.3.1 Crioinfartos

El pez cebra es capaz de sobrevivir y regenerar el corazón después de ser sometido a un crioinfarto que afecte hasta al 25% del ventrículo y en el que todas las capas del mismo se ven afectadas (epicardio, miocardio y endocardio). El tiempo de regeneración de esta lesión es algo más largo que para el caso de la amputación y las diferencias más fácilmente cuantificables (Gonzalez-Rosa et al., 2011). El crioinfarto produce muerte celular, una fuerte respuesta inflamatoria y grandes cambios en la morfología del tejido (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011; Wang et al., 2011). Un día después del crioinfarto (1dpi), la capa compacta del corazón es más fina y sus cardiomiocitos han perdido su morfología, al igual que ocurre en el miocardio trabecular, y acumulan grandes vacuolas como consecuencia de su entrada en apoptosis (Schnabel et al., 2011)(Figura 9). La apoptosis es máxima a las pocas horas de producirse la lesión y afecta a la practica totalidad de células que se encuentran en la zona (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011). La apoptosis

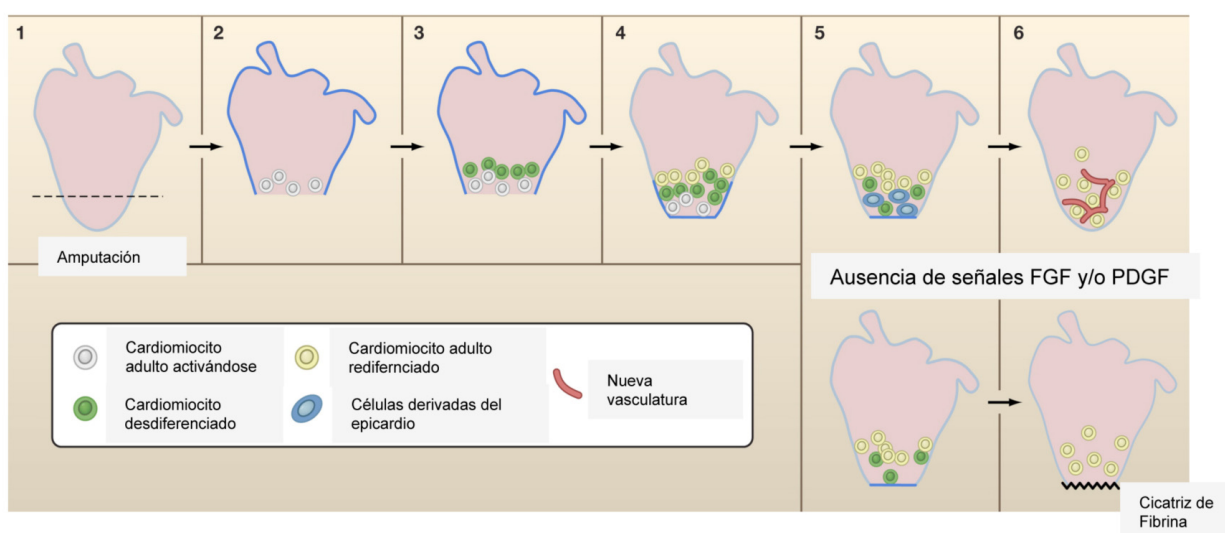
Introducción

afecta también a la vasculatura coronaria que se encuentra fuera del área lesionada, seguramente como consecuencia de la hipoxia producida por la falta de riego sanguíneo (Gonzalez-Rosa et al., 2011). A partir de 3 dpi, el número de células apoptóticas es muy bajo. A 1dpi, encontramos también un gran enriquecimiento en eritrocitos y gran número de leucocitos que han invadido la zona, neutrófilos y granulocitos (Schnabel et al., 2011) (Figura 9). En los márgenes de la herida aparecen células positivas para la kinasa de la cadena ligera de miosina, un marcador de músculo liso, miofibroblastos y trombocitos, lo que sugiere la presencia de estos últimos para cerrar la lesión (Gonzalez-Rosa et al., 2011). A 3dpi, se observan células positivas para este marcador en el interior del área infartada, y su número aumenta aún más a 21 dpi hasta casi desaparecer a 90 dpi, lo que sugiere la formación de una cicatriz miofibroblástica (Gonzalez-Rosa et al., 2011). A los 3 dpi, el daño alcanza su máxima extensión, caracterizada por la deposición de una gran matriz fibrótica y la ausencia de cardiomiocitos funcionales. En el exterior, el epicardio se ha engrosado y

tiene varias capas, sobre todo en la zona del infarto y en los alrededores (Gonzalez-Rosa et al., 2011).

En los primeros días tras la criolesión, las células de las tres capas del corazón, así como las del endotelio vascular, comienzan a proliferar (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011). La proliferación es máxima en los primeros días y, mientras que la proliferación del endocardio y miocardio se da preferentemente dentro del área infartada, la del endotelio vascular se da en zonas alejadas y la del epicardio se distribuye uniformemente por todo el corazón aunque se concentra más en la zona del infarto y su periferia (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011). La proliferación va disminuyendo poco a poco con hasta que a 60 dpi el corazón regenerado es indistinguible de la un corazón no dañado (Chablais et al., 2011).

Respecto a la vasculatura del área regenerada, parece que se forma por angiogénesis, a partir de los vasos de los bordes del área infartada, ya que



Modificado de (Curado and Stainier, 2006)

Figura 10. Implicaciones de la pérdida de señalización de FGF y/o PDGF durante la regeneración del corazón.

La inhibición de la señalización de estas vías tienen como consecuencia que las células derivadas del epicardio no sufran TEM y no puedan invadir ni migrar por la zona dañada para formar parte como células murales o pericitos de la nueva vasculatura que irrigará la zona perdida. Esto hace que la vasculatura no se forme y se bloquee la regeneración (Curado and Stainier, 2006; Kim et al., 2010; Lepilina et al., 2006).

progresivamente aparecen brotes capilares desde la región adyacente a la lesión, que van invadiendo y vascularizando el área infartada (Gonzalez-Rosa et al., 2011). A los 60 dpi, la cicatriz rica en colágeno que se había formado ha desaparecido casi por completo y el corazón es funcional, aunque el ventrículo ha adquirido una forma más redondeada, la pared ventricular se ha engrosado y puede apreciarse cierta arritmia en las contracciones ventriculares (Gonzalez-Rosa et al., 2011).

3.4 Señalización durante la regeneración cardiaca

Se han implicado diferentes vías de señalización celular durante la regeneración del corazón y para algunas de ellas se han llevado a cabo estudios funcionales, con el fin de determinar su importancia y posición en la secuencia de eventos que tienen lugar durante el proceso regenerativo. Entre las más importantes y mejor conocidas están la de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) (Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006), la del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kim et al., 2010) y la del ácido retinoico (Kikuchi et al., 2011b; Lepilina et al., 2006).

La primera de las vías implicada en la regeneración cardiaca es la de los FGFs (Lepilina et al., 2006). Durante la regeneración del corazón, en el modelo de amputación, se aumentan los niveles de expresión de los receptores 2 y 4 (*fgfr2* y *fgfr4*) en el epicardio, y del ligando 17b (*fgf17b*) en el miocardio (Lepilina et al., 2006). La inhibición de la señalización de FGF mediante la sobreexpresión inducible de un dominante negativo inhibe la TEM que tiene lugar durante el proceso regenerativo y es necesaria para que células del epicardio invadan la herida y formen parte de la nueva vasculatura en la zona amputada (Figura 8). Al inhibir la vía de FGF durante 30 días se inhibe la regeneración y se observa una cicatriz de fibrina y colágeno que no contiene cardiomiocitos maduros ni vasos sanguíneos (Lepilina et al., 2006) (Figura 10). Además, se ha visto que la vía de FGF

está también implicada en la homeostasis del corazón, mediante la regulación de la adición de nuevas células epicárdicas. La inhibición de la vía en condiciones normales da lugar a la aparición de cicatrices de fibrina en la pared del ventrículo (Wills et al., 2008a).

Otra de las vías de señalización que juegan un papel importante durante la regeneración del corazón es la de PDGF. Esta vía está también implicada en los procesos de TEM del epicardio para contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos en el área en regeneración (Kim et al., 2010) (Figura 8). *Pdgfr β* se expresa a partir de 3 dpa en el epicardio y posteriormente a partir de 7 dpa también en la zona de la herida (Kim et al., 2010; Lien et al., 2006). Los niveles de expresión de *pdgfra* también aumentan a partir de 7 dpa y se mantienen hasta al menos 14 dpa, si bien sus niveles son muchos menores que los de *pdgfr β* (Kim et al., 2010; Lien et al., 2006). En la zona de la herida son los trombocitos los responsables de la expresión de *pdgfr β* (Kim et al., 2010). La inhibición farmacológica de la vía afecta tanto a la proliferación del epicardio como a la del miocardio y hace que encontremos un número menor de células del epicardio y de cardiomiocitos en proliferación en corazones de 7 dpa (Kim et al., 2010; Lien et al., 2006) (Figura 10). Asimismo se ha visto que PDGF *in vitro* es capaz de inducir la proliferación de cardiomiocitos en cultivo e inducir la formación de fibras de estrés y la pérdida de los contactos célula-célula y el fenotipo epitelial en células epicárdicas en un explante de corazón (Kim et al., 2010; Lien et al., 2006). La inhibición farmacológica de PDGF durante la regeneración tiene también como consecuencia que bajen los niveles de expresión de genes marcadores de TEM y de células murales, *snail2* y *acta2* respectivamente, y que casi no se observen vasos sanguíneos irrigando el área de amputación a 14 dpa (Kim et al., 2010) (Figura 10).

Otra vía implicada en la regeneración del corazón es la de RA (Kikuchi et al., 2011b). Durante la regeneración del corazón, aumenta la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa 2 (*raldh2*) tanto en el epicardio como en el

endocardio (Kikuchi et al., 2011b; Kikuchi et al., 2010; Lepilina et al., 2006; Lien et al., 2006; Mathew et al., 2009). Como ya se ha mencionado anteriormente, *raldh2* se encarga del paso de conversión final desde la vitamina A hasta ácido retinoico y está implicada en el desarrollo cardíaco (Azambuja et al.; Duester, 2008; Guadix et al., 2011; Laforest et al., 1998; Lin et al., 2010; Mic et al., 2002; Niederreither et al., 2001; Ryckebusch et al., 2008; von Gise et al.). *Raldh2* se expresa a partir de 3 hpa por todo el epicardio y endocardio del ventrículo y de la aurícula. En el endocardio esta expresión queda restringida a la zona de la herida a partir de las 24 hpa mientras que en el epicardio no lo hace hasta los 7dpa (Kikuchi et al., 2011b; Lepilina et al., 2006). *Raldh2* se expresa en el endocardio en respuesta a diferentes formas de daño cardíaco y a la inflamación no producida por daño mecánico y se mantiene en la zona dañada mediante interacciones locales (Kikuchi et al., 2011b; Wang et al., 2011). La inhibición de la señalización por RA mediante la sobre-expresión de una forma dominante negativa del receptor o mediante la sobre-expresión de la enzima encargada de su degradación, da como resultado la inhibición de la proliferación de los cardiomiocitos del corazón en regeneración (Kikuchi et al., 2011b). El RA actúa como una señal permisiva de la proliferación y no instructiva, como sugiere la observación de que la administración exógena de RA no induce la proliferación de los cardiomiocitos (Kikuchi et al., 2011b). Además se ha visto que *Polypterus senegalus*, una especie de pez muy lejana evolutivamente del pez cebra y más cercana a los tetrápodos, es capaz de regenerar en cierta medida el corazón y también de inducir y mantener la expresión de *raldh2* por todo el epicardio y el endocardio (Kikuchi et al., 2011b). Esta observación unida al hecho de que los ratones adultos no sean capaces de regenerar el corazón ni de inducir ni mantener la expresión de *raldh2*, sugiere que la señalización mediada por RA juega un papel clave en la capacitación del corazón para regenerar (Kikuchi et al., 2011b).

OBJETIVOS

- 1) Establecimiento de los modelos de regeneración cardiaca y de regeneración de la aleta caudal en el pez cebra.
- 2) Identificación de nuevos genes implicados en los procesos de regeneración del corazón y/o la aleta caudal mediante el estudio del perfil de expresión génica utilizando micromatrices de alta densidad.
- 3) Validación de una selección de los genes identificados en el análisis del perfil de expresión génica mediante RT-PCR e hibridación *in situ*.
- 4) Validación de la implicación funcional de los genes seleccionados mediante estudios funcionales de represión de su función durante la regeneración de la aleta, utilizando inhibidores farmacológicos o mediante la inyección y electroporación de morfolidos.
- 5) Generación de modelos transgénicos de pérdida y/o ganancia de función de los genes seleccionados, con el fin de determinar en detalle su implicación funcional durante la regeneración de la aleta y del corazón.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MANTENIMIENTO, CRÍA Y OPERACIONES EN EL PEZ CEBRA

Los peces cebra (*Danio rerio*) se han criado y mantenido bajo condiciones estándar: a 28° C y con ciclos de luz de 12 horas de duración. Todos los experimentos se llevaron a cabo con peces de entre 6 y 18 meses de edad. Las operaciones de amputación se hicieron según está descrito, tanto para el caso de los corazones (Poss et al., 2002a; Raya et al., 2003) como en el de las aletas (Poss y al., 2000a). Los crioinfartos se hicieron siguiendo el protocolo descrito en (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011) utilizando una sonda de cobre enfriada en nitrógeno líquido. En el caso de la regeneración de las aletas se pusieron los peces inmediatamente después de la operación en agua a 33° C donde se mantuvieron para que regeneraran durante 12, 24, 48 y 72 horas. Los peces a los que se les había amputado parcialmente el corazón o se les había infartado se mantuvieron en condiciones estándar. Pasado el tiempo de regeneración se sacrificaron y se extirparon las aletas y/o los corazones.

2. RECOLECCIÓN DEL TEJIDO Y EXTRACCIÓN DE RNA

Para obtener ARN de corazones y aletas en regeneración a diferentes tiempos, se sacrificaron los animales y se disecaron las aletas o los corazones. Las operaciones de recolección de los corazones y las aletas fueron realizadas en PBS limpio de RNAsas y a 4°C. En el caso de los corazones se les quitó la zona más distal al plano de amputación así como el bulbo arterial y la aurícula. En el caso de las aletas cortamos 1 ó 2 segmentos esqueléticos por debajo del plano de corte. Para cada punto se utilizaron entre 12 y 17 corazones y 8 -12 aletas. El material se congeló rápidamente en TRIzol (Invitrogen) y se guardó a -80°C hasta el momento de hacer la extracción de ARN total. Esta se hizo siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen) y a continuación se purificó el RNA total utilizando RNeasy Mini

Kit (Quiagen). Determinamos la cantidad y la calidad del RNA por absorbancia a 260nm y 280nm y con el Bioanalyzer 2100 de Agilent.

3. HIBRIDACIÓN Y ANÁLISIS DE MICROARRAYS

La hibridación de los microarrays fue realizada por el servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB). El cRNA biotinilado fue sintetizado a partir de RNA total con el kit “3’ Amplification One-cycle Target labeling” (Affymetrix, Santa Clara, CA) y fue utilizado para la hibridación de los Zebrafish arrays de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se utilizaron 2 mg de ARN total por punto. La distribución de tamaños del cRNA se determinó con el Bioanalyzer 2100 de Agilent. Posteriormente el cRNA fue fragmentado a 95°C durante 35 minutos para obtener cadenas de 35 a 200 pb que se hibridaron con Affymetrix Zebrafish microarrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) a 45°C durante 16 horas. Cada microarray fue lavado y teído usando el Affymetrix Fluidics Station 450 y siguiendo los protocolos diseñados por Affymetrix. Finalmente se escanearon los microarrays en el Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G.

El análisis se realizó utilizando el algoritmo MAS5 de Affymetrix. En el análisis conjunto de la regeneración de la aleta y el corazón se seleccionaron aquellos genes que estaban presentes en todos los tiempos, que aparecían aumentados o disminuidos también en todos los tiempos (4 tiempos) con respecto al control, y donde el cambio era en al menos uno de ellos con un ratio (log2) mayor o igual a 1 ó menor o igual -1.

En el análisis independiente de la regeneración del corazón se seleccionaron aquellos genes que estaban presentes en todos los tiempos, aparecían aumentados o disminuidos en al menos 3 de los 4 tiempos con respecto al control y con un ratio (log2) mayor o igual a 1 ó menor o igual -1 para la menos uno de ellos.

Materiales y Métodos

En el análisis independiente de la regeneración de la aleta se siguieron los mismos criterios de selección que en el caso anterior (análisis independiente de la regeneración del corazón).

El análisis por clustering jerárquico se realizó con el Multiexperimental Viewer (TIGR) y con Spotfire®. El análisis funcional y de Ontología se realizó con DAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/>) y GeneOntology mining tool (Affymetrix).

4. PCR CUANTITATIVA

Se recolectaron corazones y aletas y se extrajo el ARN total de la manera que hicimos para la hibridación de microarrays (ver más arriba). Sintetizamos cDNA a partir de RNA total de corazones y/o aletas utilizando First Strand Síntesis Kit (GE Healthcare) siguiendo el protocolo del fabricante y usando los oligos “random” (oligos de 6 bases de longitud y secuencias al azar) que proporciona el fabricante. La cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos usados en la qPCR.

Fibronectin -1a Directo	AGAGGGATCACCTGCCATC
Fibronectin -1a Reverso	GTGGTGCCACATCAGAGA
Fibronectin -1a Directo	CGCAATACATCCTGAAGTGG
Fibronectin -1b Reverso	GTTGATGTGGCCAGGAATG
Integrina alfa 5 Directo	GTGGCGATTCTAGCTGGTCT
Integrina alfa 5 Reverso	CCGTATGGAGTTCGCTTGA
CTGF Directo	GTCTCGCCTTTGCATGGT
CTGF Reverso	GATGCATTTTTCCCTTTCCT
Keratina 18 Directo	GCCAATCGTTGATGAGCTG
Keratina 18 Rverso	AGCACTAGGCGAGCATTGTT
JunB Directo	CGCTGAAACTGGCCTCTC
JunB reverso	ATGACGCCGTTAACC GTTCT
JunB-like Directo	GCGACGGGACTTTCACTAAA
JunB-like Reverso	CGTTCAGTTGTCTGAACAAACA
Hyo1 Directo	TTTAGCAGTCAACAGGAACCAA
Hyo1 Reverso	TGACAGCTTTTCCCTCATTGT
Midkine-a Directo	TGGAGAAGAGTGAACACAGCA
Midkine-a Reverso	ACGAGGAGGGTGGAAACA
Caveolina-1 Directo	TCATCTGATCGCACTTCAGG
Caveolina-1 Reverso	TAAACGCGAGTGAGCGTAT
Pescadillo Directo	GAACCTACTATCTGCTGAAAGACATCC
Pescadillo Reverso	GCAGCTTCCGGACAAAGAT
Sal-like1 Directo	CCTAGCCGAGCACAAATGG
Sal-like1 Reverso	TGGTGTTGTTCAAGATCCGATA
Sox11a Directo	TCCAGGGAATCTCTCCCTCT
Sox11a Reverso	GCTGCCCTCGCTAAAAGAC
Sox11b Directo	CATTGCGCATCTTCAGGTTA
Sox11b Reverso	CCGTCTAAACCGGGACAAC
GADPH Directo	ACACTCACCCAAGTGTCAGGA
GADPH REverso	CGACCGAATCCGTTAATACC
Beta Actina 1 Directo	GATCTTCACTCCCCTTGTTCA
Beta actina 1 Reverso	GGCAGCGATTTCCTCATC

La temperatura de anillamiento utilizada en todos ellos fue de 60°C y el tamaño del amplicón variaba entre los 75 y 115 nucleótidos.

se realizó usando un termociclador C1000 con un sistema de detección CFX96 (Bio-Rad) y una mezcla de reacción Mazxima SYBR Green qPCR (Fermentas). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 1.

5. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

La hibridación *in situ* de ARN en corazones y aletas enteros (whole mount *in situ* hybridization) se ha realizado según protocolos publicados (de la Pompa et al., 1997) variando los tiempos de tratamiento con proteinasa K según está descrito para las aletas (Poss et al., 2000) y para el corazón (Poss et al., 2002a). Las aletas y corazones fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS durante toda la noche a 4° C y llevados hasta metanol 100% al día siguiente, momento en que se guardaron a -80° C hasta empezar la hibridación.

La hibridación *in situ* de ARN en secciones de parafina se ha realizado siguiendo protocolos publicados anteriormente (Kanzler et al., 1998) con pequeñas variaciones. Previamente los corazones y aletas fueron fijados a 4° C durante toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente se han llevado a etanol 100%, xileno y, finalmente, a parafina para ser cortados en secciones de 7 micras de grosor.

6. INYECCIÓN Y ELECTROPORACIÓN DE MORFOLINOS EN ALETAS.

Los MO son oligonucleótidos modificados de alrededor de 25 pares de bases que se unen específicamente al ARN mensajero del gen contra el que van dirigidos (Summerton and Weller, 1997). La modificación consiste en que en vez de un anillo de ribosa de cinco elementos llevan un anillo modificado de 6 elementos llamado morfolino. Este cambio los hace más estables y resistentes a la degradación por la maquinaria intracelular (Summerton and Weller, 1997). Su modo de acción es mediante la unión específica y antisentido al mARN contra el que van dirigidos, lo que resulta en

un bloqueo de la traducción (Summerton and Weller, 1997) o del procesamiento del pre-mARN (Draper et al., 2001) o de la actividad de los microARNs (Flynt et al., 2007). Todos los morfolinos (MO) usados en esta tesis habían sido probados con anterioridad en estudios de desarrollo de pez cebra, fueron adquiridos en Gene-Tools (Gene Tools, USA) y resuspendidos en agua miliQ a una concentración final de 5 mM. Todos llevaban acoplada fluoresceína para comprobar que el MO se había introducido en las células. La secuencia de los MO utilizados fue: *raldh2* GTTCAACTTCACTGGAGGTCATC (Begemann et al., 2001); *mdka* CCGCATTTTGTCTTCTGTGTCGAAA (Schafer et al., 2005); *syndecan2* GGTTCCTCATAATTCCTCAGTCTTC (Chen et al., 2004); *cav-1* TCATGCTGTCCCGTGCCTGAAGTGC (Nixon et al., 2007) *PTRF-cavina* GACGGCTGTCTTCAATCACCTCCAT (Hill et al., 2008). La inyección y electroporación de MO se hizo siguiendo un protocolo descrito con anterioridad (Jazwinska et al., 2007) aunque con algunas pequeñas modificaciones. Los MOs fueron inyectados con la ayuda de un microinyector (FemtoJet 5247, Eppendorf) y capilares de cristal de 1mm de diametro con filamento (World Precision Instruments, Inc.) en la mitad dorsal de aletas de 48 hpa. La mitad ventral fue considerada como el control interno para monitorizar la regeneración en condiciones normales. Inmediatamente después de la inyección del MO, la aleta fue electroporada usando unas pinzas y un electroporador (Electro Square Porator ECM 830, BTX, Harvard Apparatus) y siguiendo los siguientes parámetros: 5 tandas separadas entre sí unos 30 segundos de 3 pulsos de 15V de potencia y 50ms de duración separados entre sí 1 segundo. A continuación las aletas fueron fotografiadas utilizando una lupa Leika MZFLIII junto con una cámara Olympus DP71. Dos días más tarde se volvieron a fotografiar las mismas aletas.

Para medir el área regenerada de la aleta se utilizó el programa ImageJ64. Con el fin de calcular el porcentaje de área regenerada en la mitad inyectada frente a la mitad control se insertaron los valores de las áreas en la siguiente

fórmula: $(\text{Exp } 2\text{dpi} - \text{Exp } 0\text{dpi}) / (\text{Cont } 2\text{dpi} / \text{Cont } 0\text{dpi}) \times 100$, donde Exp es el área regenerada en la mitad inyectada con el MO y Cont es el área correspondiente a la regeneración de la mitad control no inyectada.

7. INMUNOFLUORESCENCIA Y TINCIONES HISTOLÓGICAS.

La inmunofluorescencia para la detección de bromodesoxiuridina (BrdU) y fosfo-histona 3 (PH3) en aletas enteras se ha realizado siguiendo un protocolo descritos anteriormente (Poss et al., 2002a). El anticuerpo anti-PH3 ha sido utilizado para marcar el contorno de la aleta (Lee et al., 2005). Media hora antes de ser sacrificados se pusieron los peces en un tanque de agua al que se ha añadido BrdU a una concentración de 10uM. Posteriormente se les cambió el agua varias veces para lavar el exceso de BrdU, se sacrificaron y se fijaron las aletas en fijador Carnoy (60% etanol, 30% cloroformo y 10% ácido acético) a 4° C durante toda la noche antes de comenzar la inmunofluorescencia. Los anticuerpos usados han sido un monoclonal contra BrdU (1:100, Chemicon International Inc.) y un policlonal de conejo contra PH3 (1:200, Upstate biotechnology).

La inmunofluorescencia para la detección de cardiomiocitos en proliferación se ha hecho en cortes de parafina siguiendo protocolos descritos anteriormente (del Monte et al., 2011). Los corazones fueron fijados a 4° C durante toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente se han llevado a etanol 100%, xileno y, finalmente, a parafina para ser cortados en secciones de 7 micras de grosor. Los antígenos se han expuesto mediante el calentamiento en tampón citrato (ph 6.0) de las muestras durante 15 minutos en un horno microondas a máxima potencia. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-PCNA ("proliferating cell nuclear antigen") (murino, Sigma) para detectar células en proliferación y anti-Mef2 (Santa Cruz Biotechnology) para detectar cardiomiocitos. El índice de proliferación de los cardiomiocitos se obtuvo siguiendo la metodología descrita

anteriormente en trabajos previos similares (Kikuchi et al., 2011b).

La detección de colágeno y fibrina en corazones se ha realizado siguiendo el método de Picro-Mallory. De nuevo los corazones fueron fijados a 4° C durante toda la noche en paraformaldehído al 4% en PBS. Posteriormente se han llevado a etanol 100%, xileno y, finalmente, a parafina para ser cortados en secciones de 7 micras de grosor. Con este método el colágeno se tiñe de azul, la fibrina de rojo y el músculo sano de marrón claro.

8. INHIBIDORES

Se han utilizados dos inhibidores químicos de la síntesis de ácido retinoico comprados a Sigma, 4-dietilaminobenzaldehído (DEAB) y 3,7-dimetil-2,6-octadienal (Cital). Para inhibir la regeneración de la aleta y el corazón se han puesto hasta 4 peces en tanques de 1 litro con agua en la que se ha añadido DEAB o Cital a distintas concentraciones (25 ó 50 uM en el caso de DEAB y 10uM en el caso de Cital) y durante distintos tiempos (desde unas horas hasta varios días). En los experimentos en los que se ha inhibido durante varios días la síntesis de RA, se ha cambiado diariamente el agua y se ha añadido de nuevo el inhibidor. Como control se ha añadido el mismo volumen de DMSO que se añadía de inhibidor (disuelto en DMSO).

9. GENERACIÓN DE MODELOS TRANSGÉNICOS DE PERDIDA O GANANCIA DE FUNCIÓN.

Durante el desarrollo de esta tesis han sido generadas 6 líneas transgénicas de pez cebra donde se ha puesto bajo el control de un promotor inducible distintas versiones salvajes o dominantes negativas de distintos genes de interés. Partiendo de un vector que llevaba el promotor de la proteína de choque térmico de 70 kDa en 3' de la secuencia de reconocimiento para la meganucleasa SpeI se ha introducido (3' del promotor) mediante digestión y

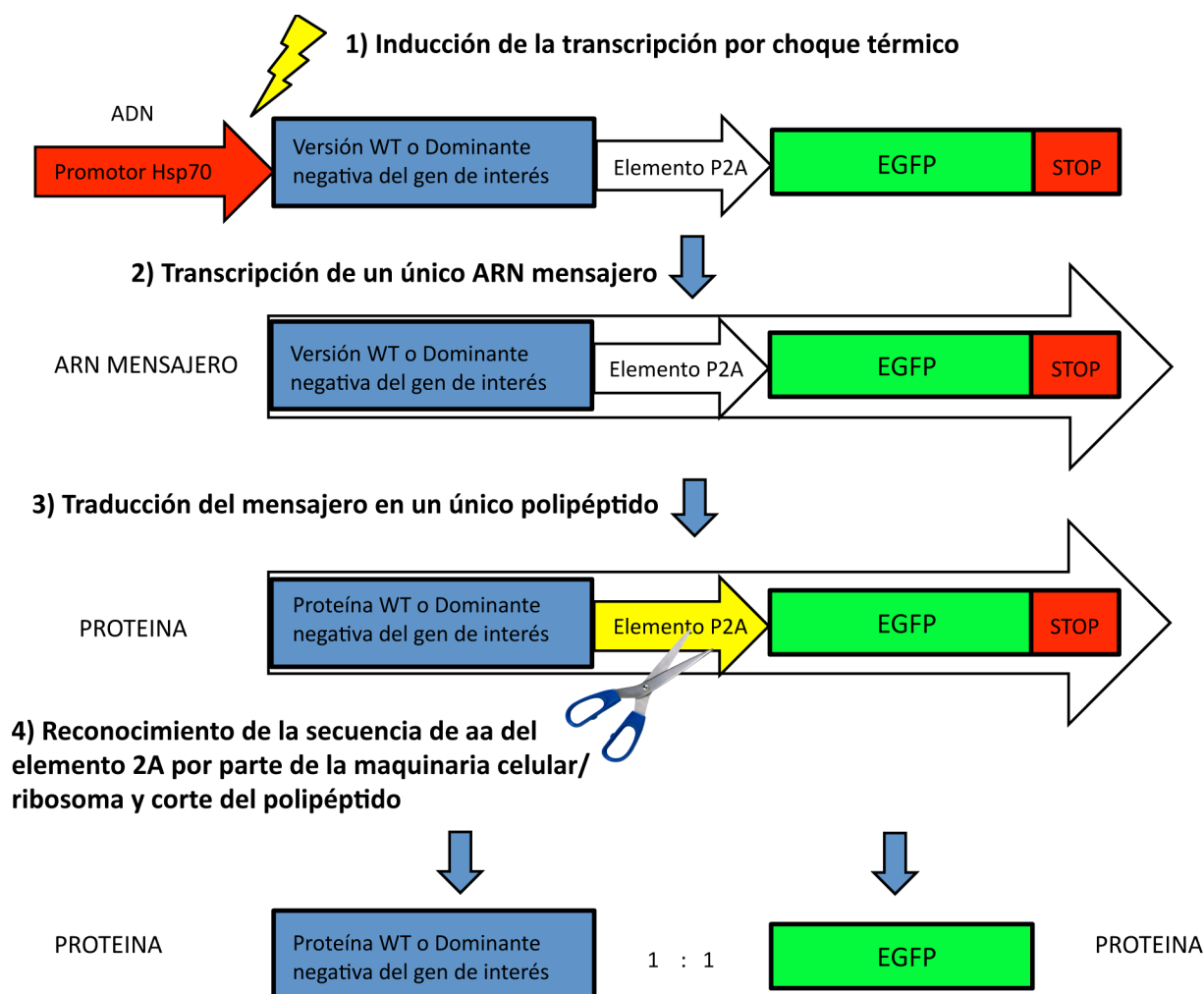


Figura 11. Esquema del funcionamiento de las líneas transgénicas. Las distintas líneas transgénicas generadas funcionan de la misma manera. (1) Cada una lleva un gen de interés distinto bajo el control del promotor inducible por choque térmico de la proteína de choque térmico de 70 kDa (promotor de hsp70). Los genes de interés llevan en 3'- y en la misma pauta de lectura un elemento 2A y el gen de la versión mejorada de la proteína verde fluorescente (eGFP). (2) Tras la inducción por choque térmico se activa la expresión del promotor hsp70 y se transcribe un único ARN mensajero. (3) Este mensajero va a traducirse como un único polipéptido. (4) Durante la traducción el elemento 2A va a ser reconocido por el ribosoma/maquinaria celular y se va a cortar dando lugar a dos proteínas: la proteína de interés y la proteína reportera (eGFP). La relación entre la proteína de interés y la reportera es de 1:1.

ligación el polilinker del vector pSL301 desde HindIII hasta SalI. Con este fragmento se han introducido nuevos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción de corte único para facilitar posteriormente el clonaje (en total 30 distintos).

Se ha utilizado el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) como reportero y se ha separado del gen de interés mediante un elemento P2A (péptido 2A) derivado de virus. Tanto el gen de interés como el elemento 2A y el gen reportero han de estar en la misma pauta de lectura y sin codones de terminación de la

traducción entre ellos. Es una única pauta de lectura abierta (open reading frame: ORF) que se transcribirá como un solo ARN mensajero y, posteriormente, durante la traducción, dará lugar a 2 proteínas (de Felipe et al., 2006; Provost et al., 2007) (Figura 11). La relación entre la proteína de interés y la reportera (eGFP) va a ser 1:1 (de Felipe et al., 2006). Se han clonado por PCR el elemento 2A, la proteína verde fluorescente y el intrón de sv40. A todos ellos se les han añadido en los extremos 5' de los oligos secuencias de reconocimiento para distintas enzimas de restricción para facilitar el

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para generar el vector hsp70: P2A-EGFV.

P2A- D (NotI)	CCAACC GCGGCCGCTGCTACAAACTTCAGCCTGCTG
P2A-R (NdeI)	CCAACC CATATGCGGTCCAGGGTTCTCCT
EGFP D (NdeI)	TTAATTCATATGGTGAGCAAGGGCGAGG
EGFP R (XbaI)	TTCCTT TCTAGACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
SV40 D (XbaI)	CCAACC TCTAGAGATCCAGACATGATAAGATACAT
SV40 R (Sall)	CCAACC GTCGACAAAAAACCTCCACACCT

Entre paréntesis aparece la enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento se añadió en 5' de la secuencia del gen de interés para facilitar su clonaje por restricción. La parte de la secuencia del oligo resaltada en verde corresponde a la parte espaciadora del oligo en 5'. La parte de la secuencia en blanco es la secuencia de la enzima de restricción. La parte de la secuencia en amarillo corresponde a la secuencia que hibrida con el gen de interés.

clonaje en el vector (Tabla 2).

El vector resultante tiene (en sentido 5'→3') la secuencia de reconocimiento de SceI, el promotor de hsp70, el elemento 2^a, la eGFP, el intrón de sv40. Se han clonado en este vector mediante digestión y ligación los genes de interés en la misma pauta de lectura que el elemento 2A y la eGFP (Tabla 5). Estos genes de interés han sido: el gen supresor de tumores de Wilms (Wt1), midkine (mdk), syndecan y caveolina-1 (Cav-1). En el caso de wt1 se ha utilizado un dominante negativo de ratón ya descrito anteriormente (Han et al., 2007). En el caso de mdk-a se ha clonado la versión salvaje y una dominante negativa (A38) del gen mdkb de pez cebra que ya se habían utilizado anteriormente (Winkler and Moon, 2001). Se ha clonado también el fragmento de unión a midkine del receptor LRP1 de ratón que se ha demostrado que funciona como una trampa de unión y secuestro de midkine, dando lugar a un fenotipo de falta de función (Chen et al., 2007). Para syndecan se ha utilizado un dominante negativo de pez cebra que también se había descrito y probado con anterioridad (Chen et al., 2004). Finalmente en el caso de cav-1 se ha utilizado una versión mutada en un punto (S80E) del gen cav-1 de rata. Este mutante se había demostrado anteriormente que funcionaba como dominante negativo (Gonzalez et al., 2007).

Las construcciones generadas se amplificaron en bacterias, se purificaron y se inyectó el ADN purificado a una concentración de 40 ng/ul en huevos de pez cebra de la

línea silvestre AB en el estadio de una célula. La mezcla de inyección llevaba asimismo la meganucleasa SpeI a una concentración final de 1 unidad/ul y estaba disuelta en el tampón salino de esta misma enzima. Las construcciones llevaban en 5' del pomotor la secuencia para la meganucleasa SpeI. Al inyectar junto con la enzima se aumenta el porcentaje de éxito de inserción y de transmisión a la progenie (Stoick-Cooper et al., 2007b).

10. CHOQUES TÉRMICOS EN LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS.

Para determinar si la expresión del transgén daba el fenotipo esperado durante el desarrollo embrionario se han cruzado peces transgénicos de la F1, se han obtenido embriones y se han crecido en condiciones normales (28° C). A las 6 horas tras la fertilización (hpf) se les paso a una placa de petri con agua precalentada a 40° C y se les ha dejó durante al menos una hora en una estufa a 38° C antes de devolverlos a otra placa de petri con agua a 28° C. A 1 dpf se ha repetido el proceso tanto por la mañana como por la tarde. Finalmente a 2 dpf se volvieron a poner a primera hora de la mañana en agua precalentada a 40° C. Después de 2 horas se han sacado fotografías utilizando una lupa Leika MZFLIII y una cámara Olympus DP71. En el caso del transgénico de pérdida de función de caveolina-1, Tg(hsp70:cav1-DN), se tomaron las fotografías a 1 dpf en vez de 2 dpf.

Para inducir la expresión del transgén durante la regeneración de la aleta se han

Tabla 3. Oligos utilizados para generar las distintas contrucciones de ganancia o pérdida de función.

WT1 ZF - KTS Directo (HindIII)	CCAACCAAGCTTAGTGAGAAACGTCCTTTCATG
WT1 ZF - KTS Reverso (NotI)	CCAACCGCGGCCGCAAGCGCCAGCTGGAGTTT
MDk2 Directo (HindIII)	CCAACCAAGCTTAGTGGGAGTTTGTCTCT
Mdk2 Reverso (NotI)	CCAACCGCGGCCGCTGTTTTCTTCCCTTTTCCT
A38 Reverso (NotI)	CCAACCGCGGCCGCTGACTTTGCACTTGGTTTTCT
LRP1 mdk-trap Directo (HindIII)	CCAACCAAGCTTAACCCATCCTACGTGCCTCCA
LRP1 mdk-trap Reverso (NotI)	CCAACCGCGGCCGCTGTGGCTGCAGCCGGCTT
Syndecan-2 Directo (HindIII)	CCAACCAAGCTTAGGAGGAACCTTTGGATGATTTT
Syndecan-2 Reverso (NotI)	CCAACCGCGGCCGCTTACGGTTTCTCTCTCCCAG
Cav1 Directo (HindIII)	CCAACCAAGCTTAGTCTGGGGGTAAATACGT
Cav1 Reverso (NotI) (sirve para la WT y la mutada en un punto S80E)	CCAACCGCGGCCGCTATCTCTTTCTGCGTGCTGAT

Entre paréntesis aparece la enzima de restricción cuya secuencia de reconocimiento se añadió en 5' de la secuencia del gen de interés para facilitar su clonaje por restricción. La parte de la secuencia del oligo resaltada en verde corresponde a la parte espaciadora del oligo en 5'. La parte de la secuencia en blanco es la secuencia de la enzima de restricción utilizada para clonarlo en el vector hsp70: P2A-EGFP. La parte de la secuencia en amarillo corresponde a la secuencia que hibrida con el gen de interés.

utilizados peces donde se han acoplado calentadores programables (Lauda E300 Ecoline) capaces de subir/mantener/bajar la temperatura del agua. Dos horas antes de la amputación los peces se han puesto en agua a 38° C durante una hora, antes de devolverlos a la temperatura normal (28° C). Los calentadores fueron programados para subir y mantener 4 veces al día durante 1 hora el agua a 38 ° C, durante todo el tiempo que duró el experimento. Como animales control se han utilizados peces de la cepa silvestre AB.

Las mismas peceras y calentadores automáticos (Lauda E300 Ecoline) han sido utilizados para inducir la expresión en los transgénicos durante la regeneración. Dos horas antes de ser amputados o crioinfartados, se subió y mantuvo durante una hora la temperatura del

agua en 38° C. Tras ser amputados o crioinfartados se devolvieron a estas mismas peceras (a 28° C). En el caso del modelo de amputación se ha subido y mantenido la temperatura del agua a 38° C durante 2 horas una vez al día hasta el fin del experimento y comenzando a las 12 horas tras la amputación. Como animales control se han utilizados peces de la cepa silvestre AB.

En el caso de los crioinfartos se ha subido y mantenido la temperatura del agua a 38° C durante 90 minutos cada 36 horas, comenzando 12 horas después de haber sido infartados y hasta el fin del experimento. Como animales control se han utilizados peces de la cepa silvestre AB.

RESULTADOS

1. OPERACIONES DE AMPUTACIÓN DEL ÁPICE DEL VENTRÍCULO Y AMPUTACIÓN DE LA ALETA EN EL PEZ CEBRA.

El primer objetivo que nos marcamos al comienzo de este trabajo fue reproducir de manera sistemática las operaciones de amputación del ápice del ventrículo y de la aleta caudal. Para amputar la mitad de la aleta caudal, anestesiábamos los peces en triclaína. Una vez que no respondían a estímulos mecánicos (no coleteaban al ser cogidos con unas pinzas) y flotaban boca arriba, les cortamos la mitad de la aleta caudal con un escalpelo bajo la lupa de disección. Al cortar se producía un ligero sangrado que paraba muy rápidamente. Una vez cortada la mitad de la aleta caudal, reintroducíamos al pez en el tanque con agua sin triclaína. No observamos diferencias de comportamiento con respecto a peces control a los que ni se había anestesiado ni se les había amputado la aleta. El porcentaje de supervivencia con esta técnica es prácticamente del 100%.

En el caso del corazón, la técnica era más complicada ya que el corazón no es tan accesible como aleta caudal y es un órgano vital para la supervivencia del pez. La operación en sí consiste en poner al pez en agua suplementada con triclaína y una vez anestesiado, se pasaba a una placa de petri que contenía una pequeña esponja que servía de “cama” y donde se ponía al pez boca arriba para poder acceder a la cavidad pericárdica que se encuentra en la zona abdominal entre las aletas pectorales. Esta placa tenía también agua con triclaína y el pez quedaba sumergido hasta la altura de la línea lateral. De esta manera las branquias no se quedan secas y el pez puede respirar durante la operación. A continuación, con la ayuda de unas pinzas de punta recta pellizcábamos en la zona pectoral, entre la musculatura de las aletas pectorales, y con unas microtijeras de disección cortábamos a lo largo del eje mayor del cuerpo para exponer la cavidad pericárdica. Hacíamos una incisión en el pericardio para acceder al corazón y pinzábamos el ápice del ventrículo

con unas pinzas de punta recta. A continuación cortábamos el ápice del ventrículo (alrededor de un 10-15% del volumen del ventrículo) con una microtijera. Se producía un profuso sangrado que cesaba en poco tiempo (alrededor de un minuto), al formarse un coagulo que taponaba la herida. Una vez detenida la hemorragia devolvíamos el pez al tanque donde se recuperaba de la anestesia. Tras media hora no se observaban diferencias de comportamiento y natación entre peces operados y peces sin operar. En los primeros minutos podían mostrar una forma de nadar y/o de respirar anormal (girando sobre sí mismos y boqueando en exceso y/o intermitentemente). El porcentaje de peces que sobrevivían a la operación, tras un periodo de práctica por parte del manipulador, está en torno al 75-90%. El tiempo que tardábamos en operar un pez oscilaba en torno a los 5-10 minutos, lo que hacía que en una hora pudiésemos operar con éxito unos 10 peces. Estos números y la disponibilidad de un elevado número de animales de experimentación, nos permitieron llevar a cabo experimentos con un alto número de individuos.

Este método de amputación es muy similar al descrito por otros grupos y altamente reproducible (Poss et al., 2002b; Raya et al., 2003).

2. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN Y DE LA ALETA.

Con el objetivo de identificar genes implicados en la regeneración de la aleta y del corazón en el pez cebra hemos analizado el perfil de expresión génica durante ambos procesos mediante el uso de microarrays. En el caso del corazón, hemos centrado nuestro análisis en los primeros estadios del proceso con el fin de identificar genes que estuvieran involucrados en detectar el daño e iniciar la respuesta regenerativa. Para ello hemos

Resultados

extirpado corazones en regeneración a 12 horas y 1, 3 y 7 días tras la amputación (dpa). En el caso de la aleta hemos abarcado una ventana de tiempo más amplia que incluye las tres fases de

la regeneración: cierre de la herida, formación del blastema y crecimiento regenerativo. Los tiempos fueron 12, 24, 48 y 72 horas tras la amputación (hpa) y durante este tiempo hemos

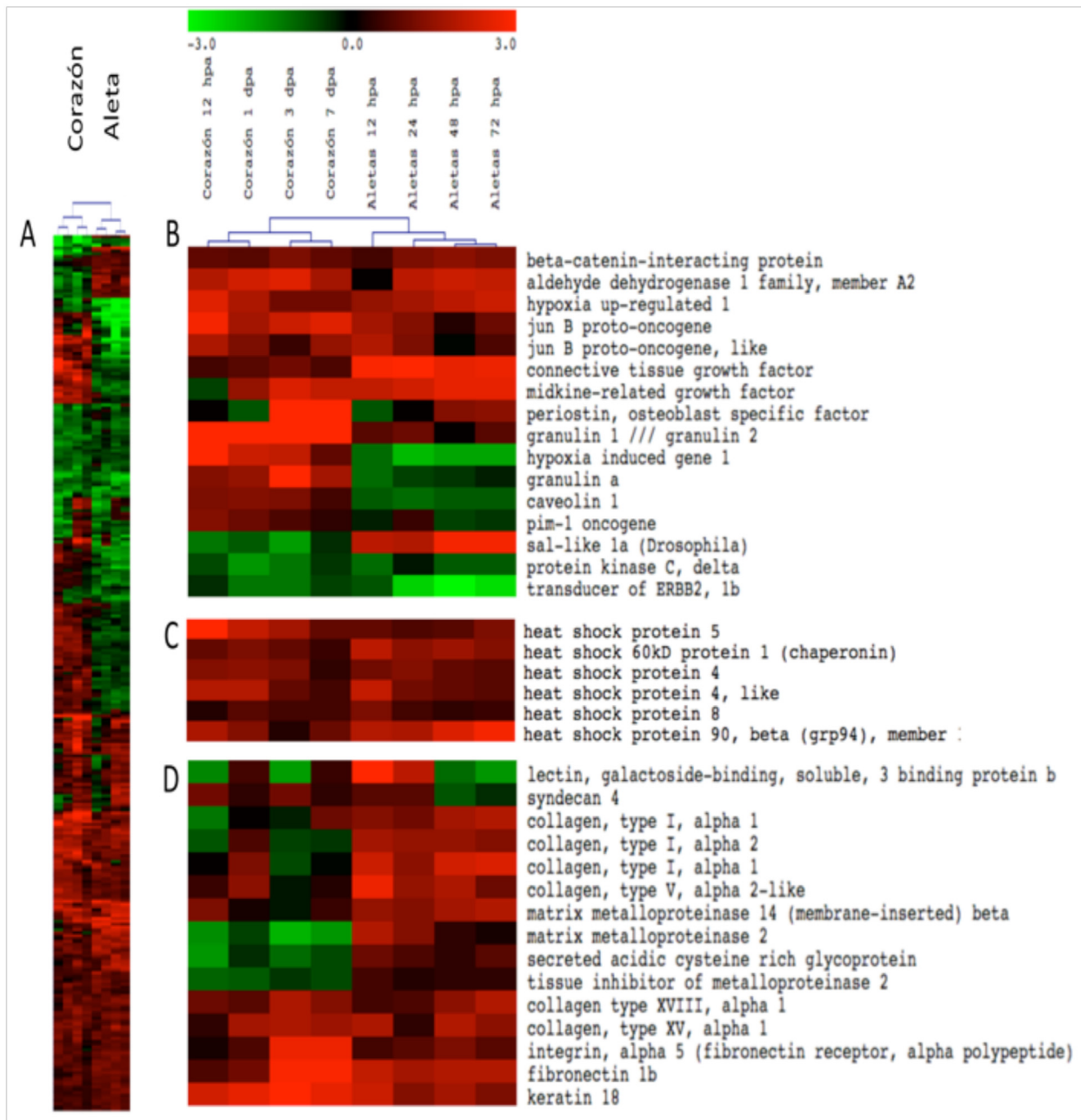


Figura 12. Los procesos regenerativos de la aleta y del corazón comparten gran cantidad de genes cuya transcripción evoluciona temporalmente (A) Agrupamiento jerarquizado de los 308 genes cuya expresión varía en todos los tiempos analizados en los microarrays durante la regeneración de la aleta y del corazón. En cada una de ellas, el valor en al menos uno de sus tiempos era mayor que +1 o menor que -1 en base logarítmica. Los tiempos analizados fueron 12, 24, 48 y 72 hpa en las aletas y 12 hpa, 1, 3 y 7 dpa en l corazón. (B) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el array y compartidos por ambos procesos regenerativos que codifican para proteínas señalizadoras (C) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el array y compartidos por ambos procesos regenerativos relacionados con el plegamiento de proteínas y la respuesta a estrés. (D) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el array y compartidos por ambos procesos relacionados con la matriz extracelular y/o su remodelación.

En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma. El color rojo indica un aumento de la transcripción y el color verde una disminución. La escala colorimétrica puede verse en la parte superior del apartado B.

mantenido los peces en agua a 33° C, ya que a esta temperatura la regeneración es más rápida y los tiempos de las distintas fases están bien caracterizados (Poss et al., 2003). Tomamos de 8 a 12 aletas por punto para hacer la extracción de ARN total, y nos quedamos únicamente con la zona distal al plano de corte (en regeneración), y con la zona inmediatamente anterior al plano de corte (2 segmentos esqueléticos). En el caso de la regeneración cardíaca hemos diseccionado 12-17 ventrículos parciales por punto para hacer una extracción de ARN total. Desechamos el bulbo arterial, la aurícula y la parte más distal del ventrículo para enriquecer las muestras con la zona más próxima al plano de amputación, ya que pensamos que sería aquí donde con mayor probabilidad se produciría la mayor parte de la señalización. Hemos utilizado los GeneChip Zebrafish Genome array de Affymetrix para hacer la caracterización de los patrones de expresión durante la regeneración de la aleta y el corazón. Esto nos ha permitido hacer un análisis simultáneo de aproximadamente 14.900 transcritos de los cuales alrededor de 10.400 correspondían a genes anotados y que cubrían un 45% del genoma.

2.1 Análisis conjunto de la regeneración del corazón y de la aleta.

Con el fin de encontrar genes que fueran importantes tanto en el proceso de regeneración cardíaca como en la de la aleta, hemos buscado aquellos genes que estuvieran presentes en todos los tiempos, que cambiaran respecto al control en todos y que este cambio fuera al menos mayor que 1 o menor que -1 en base logarítmica 2 en al menos uno de ellos (tanto en el corazón como en la aleta)¹.

De esta manera hemos identificado 308 transcritos (Figura 12A), entre los que se encuentran genes cuyo perfil de expresión era muy parecido en los 2 órganos en regeneración,

1. Un cambio de de +1 con respecto al control significa que los niveles de mRNA del gen en ese punto son el doble que los del control. Un cambio de -1 significa que los niveles están reducidos a la mitad con respecto al control.

mientras que otros mostraban un perfil de expresión contrario. Los genes se podían agrupar dentro de cuatro clases principales. En la primera de ellas los genes se comportaban de la misma manera: su expresión estaba aumentada, lo que sugería que su función podía ser necesaria para que ocurra la regeneración. En esta clase se concentraban la mayor parte de los genes. En la segunda clase los genes se comportaban de manera antagónica: en el corazón su expresión estaba aumentada, mientras que en la aleta estaba disminuida. En la tercera clase, la expresión estaba disminuida tanto en corazón como en aleta, sugiriendo, al contrario que en el primer grupo, su función no se requería para la regeneración o que inhibían el proceso en una situación de homeostasis. En la cuarta y última clase los genes se comportaban de nuevo de manera antagónica, pero en este caso su expresión estaba disminuida en el corazón y aumentada en la aleta. Hicimos también un análisis de estos genes según la anotación existente para su función y encontramos que los resultados incluían muchos genes relacionados con la matriz celular (ECM) y su remodelación. También aparecían en mayor proporción de la esperada genes de respuesta a estrés e implicados en el plegamiento de proteínas (Figura 12.C y Figura 12.D). De la misma manera, hallamos gran cantidad de genes que codificaban para proteínas de conocida función señalizadora (Figura 12.B).

2.2 Análisis in silico del transcriptoma de la regeneración cardíaca.

Buscando obtener la mayor información posible de los resultados de los microarrays, hemos estudiado independientemente los dos procesos regenerativos.. Hemos identificado 818 transcritos en la regeneración del corazón (Figura 13) y 1522 en la regeneración de la aleta (Figura 14), que estaban presentes todos los tiempos, que cambiaban al menos en tres de ellos y que el cambio logarítmico en base 2 con respecto al control es al menos en uno de los tiempos >1 ó menor o <-1. En el caso del corazón entre los genes que más nos

Resultados

llamaron la atención y no habíamos identificado previamente en el análisis conjunto estaban *Janus kinase 1*, *Socs3a*, *insulin-like growth factor 2*, *proteína 1 relacionada con ras*, *r-ras oncogén*, *RIO kinasa*, *Dicer1*, *pescadillo*, *proteína kinasa c delta* y *major vault protein*. Al hacer el análisis ontológico y funcional en base a la anotación disponible para los genes

usando la base de datos DAVID®, observamos un enriquecimiento en genes pertenecientes a la maquinaria del proteosoma. También estaban en mayor presencia de la esperada gran cantidad de genes relacionados con la función lisosomal. Además encontramos, como en el caso del análisis conjunto de los datos de corazones y aletas, una gran presencia de genes de respuesta

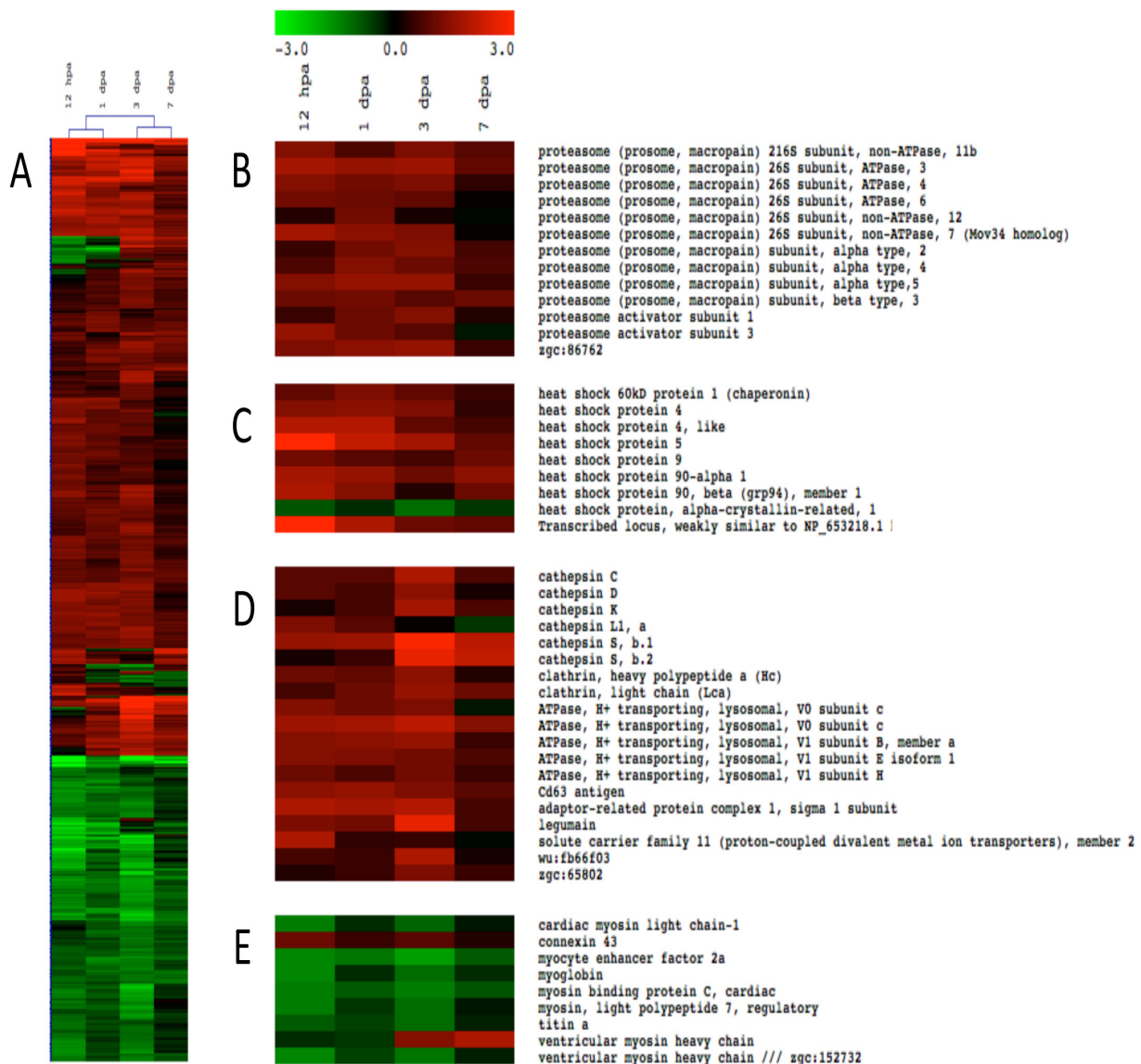


Figura 13. El análisis independiente del perfil de expresión durante la regeneración del corazón muestra gran cantidad de genes no identificados previamente, algunos específicos de la regeneración cardíaca. (A) Agrupamiento jerarquizado de los 818 transcritos cuya expresión varía durante la regeneración del corazón. Estos genes están presentes en todos los tiempos. El cambio se da en al menos 3 de los 4 tiempos analizados y es, en al menos uno de ellos, es $> +1$ o < -1 . Los tiempos analizados fueron 12 hpa y 1, 3 y 7 dpa. (B) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el análisis y relacionados con el proteosoma. (C) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el análisis del perfil de expresión génica del corazón y relacionados con la respuesta a estrés. (D) Agrupamiento jerarquizado de genes cuya expresión varía durante la regeneración del corazón y que están relacionados con el lisosoma y su función. (E) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el análisis de los datos del perfil de expresión específico de la regeneración del corazón. Todos estos genes están implicados en desarrollo y/o la homeostasis del corazón. En todas las agrupaciones la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12.

a estrés (los de choque térmico). Los niveles de transcripción de la gran mayoría de los genes de estos tres grupos estaban aumentados durante todos los tiempos analizados.

Por último, encontramos que los resultados estaban enriquecidos en genes relacionados con el desarrollo y la homeostasis del corazón. Sin embargo, al contrario que

en los grupos anteriores, la transcripción de todos ellos (a excepción de *conexina 43*) estaba disminuida durante el proceso (Figura 13).

2.3 Análisis in silico del transcriptoma de la regeneración de la aleta.

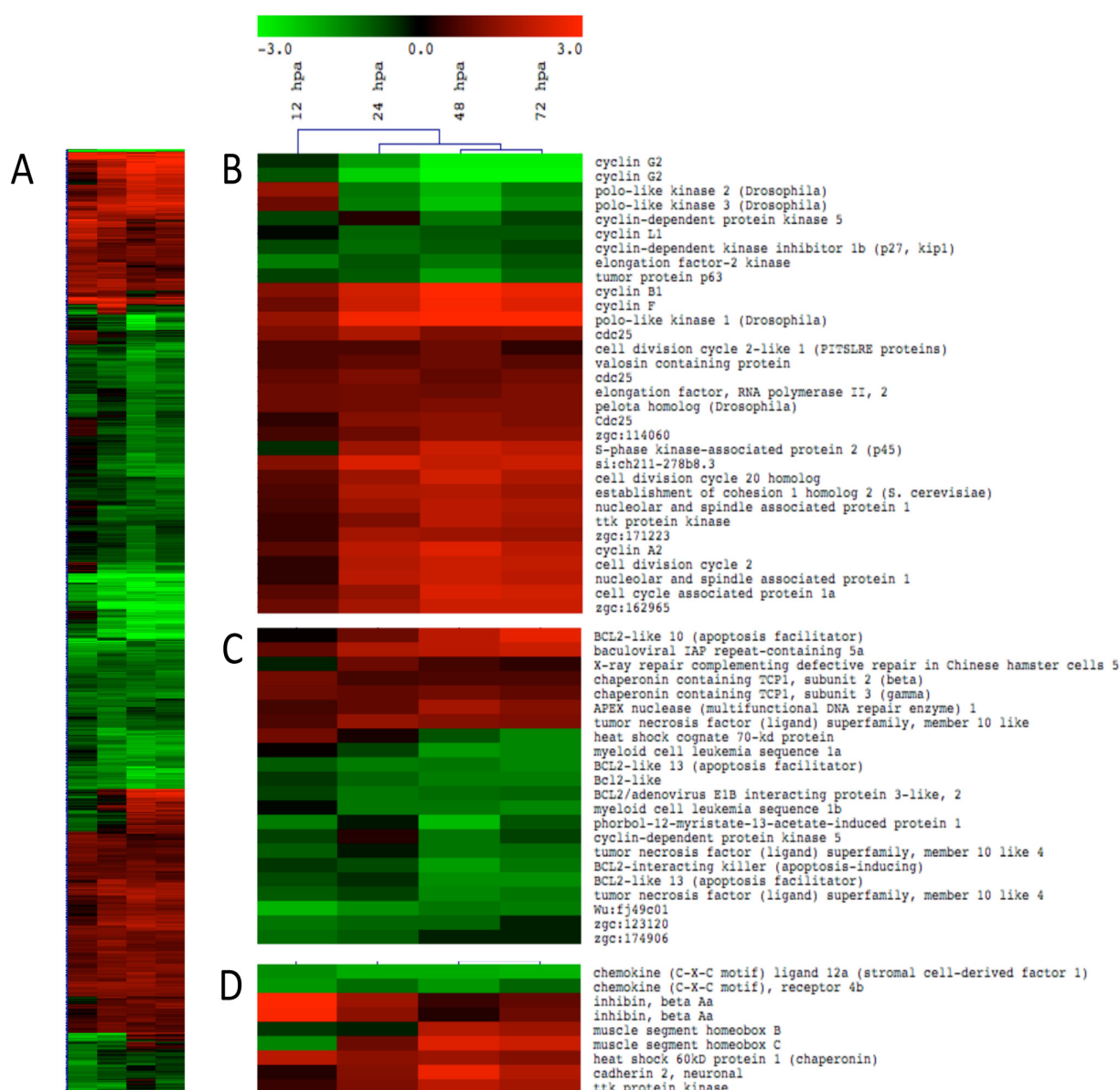


Figura 14. El análisis independiente del perfil de expresión durante la regeneración de la aleta muestra gran cantidad de genes no identificados previamente, algunos específicos de ella. (A) Agrupamiento jerarquizado de los 1.522 transcritos cuya expresión varía durante la regeneración de la aleta. Están presentes en todos los tiempos. El cambio se da en al menos 3 de los 4 tiempos analizados y es, en al menos uno de ellos, $>+1$ o <-1 . Los tiempos analizados fueron 12, 24, 48 y 72 hpa. (B) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el análisis y relacionados con el ciclo celular y su regulación (C) Agrupamiento jerarquizado de genes identificados en el análisis del perfil de expresión génica de la aleta y relacionados con la muerte celular y su regulación (D) Agrupamiento jerarquizado de genes cuya expresión varía durante la regeneración de la aleta y que están implicados en regeneración. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12.

En el caso de las aletas hemos encontrado 1.522 transcritos que estaban presentes en todos los puntos, que cambiaban en el menos tres de ellos y cuyo cambio era en al menos uno de ellos $>+1$ o <-1 en base logarítmica 2 (Figura 14A). Al hacer el análisis ontológico y funcional en base a la anotación disponible, observamos que los resultados estaban enriquecidos en genes implicados en ciclo celular. La transcripción de estos genes estaba o bien muy aumentada (como era el caso de las ciclinas A2, B1, F y de la kinasa polo-like 1) o muy disminuida (como el caso de las ciclinas G2 y L1 y de las kinasa polo-like 2 y 3) (Figura 14B). También vimos que los resultados estaban enriquecidos en genes implicados en muerte celular y su regulación. Aquí, al contrario del caso anterior donde encontrábamos una mayoría de genes cuya transcripción estaba aumentada, la expresión de la mayor parte de ellos estaba disminuida (Figura 14C). Por último, el análisis ontológico y funcional también nos mostraban un enriquecimiento en genes implicados en regeneración. Entre ellos se encontraban *cxcr4b*, *sdf-1*, *activina beta* a y los genes marcadores de blastema *msxB* y *msxC* (Akimenko et al., 1995; Nechiporuk and Keating, 2002)(Figura 14D).

3. VALIDACIÓN DE GENES IDENTIFICADOS EN EL ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL CORAZÓN Y COMPARTIDOS POR AMBOS PROCESOS.

Con el objetivo de validar los resultados que hemos obtenido con el análisis de la expresión génica mediante microarrays nos centramos en algunos de los genes identificados y analizamos mediante RT-PCR cuantitativa e ISH su expresión durante la regeneración del corazón y de la aleta.

3.1 Genes relacionados con la matriz extracelular: fibronectina 1b, integrina α 5, periostin, ctgf y keratina 18.

Como ya hemos mencionado anteriormente, una de las observaciones llamativas fue que una gran parte de los genes identificados en el análisis, y compartidos por la regeneración de la aleta y del corazón, correspondieran a proteínas relacionadas con la matriz extracelular (ECM). En los últimos tiempos es cada vez mayor la importancia que se le da a la ECM y se sabe que aparte de servir como andamiaje se encarga de regular la señalización intercelular así como multitud de procesos entre los que se encuentran la migración, la diferenciación y la homeostasis (Frantz et al., 2010; Hynes, 2009).

Dos de estos genes eran *fibronectina1a* (*fn1a*) y *fibronectina1b* (*fn1b*). Fibronectina-1 es una proteína mayoritaria de la ECM y media en una amplia variedad de procesos celulares a través de la interacción con receptores de integrina de la membrana celular. Está involucrada en promover adhesión celular al sustrato, propagación, migración celular, progresión del ciclo celular y organización del citoesqueleto (Danen and Yamada, 2001). Durante el desarrollo embrionario en pez cebra, Fn1 está implicada en la regulación de la integridad epitelial durante el ensamblaje del tubo cardíaco (Garavito-Aguilar et al., 2010; Glickman and Yelon, 2004; Matsui et al., 2007; Trinh and Stainier, 2004), la formación de límites entre tejidos (Julich et al., 2005; Julich et al., 2009; Koshida et al., 2005) y la formación de músculo (Snow et al., 2008). Además se ha descrito su participación durante la regeneración de la extremidad en anfibios (Christensen and Tassava, 2000; Gulati et al., 1983; Rao et al., 2009) y en la respuesta reparadora en miocardio tras infarto en mamíferos (Latimer and Jessen, 2010). En pez cebra se ha visto que aumenta la expresión de fibronectina durante la regeneración del nervio óptico (McCurley and Callard, 2010). De la misma manera se conoce la importancia de fibronectina como regulador

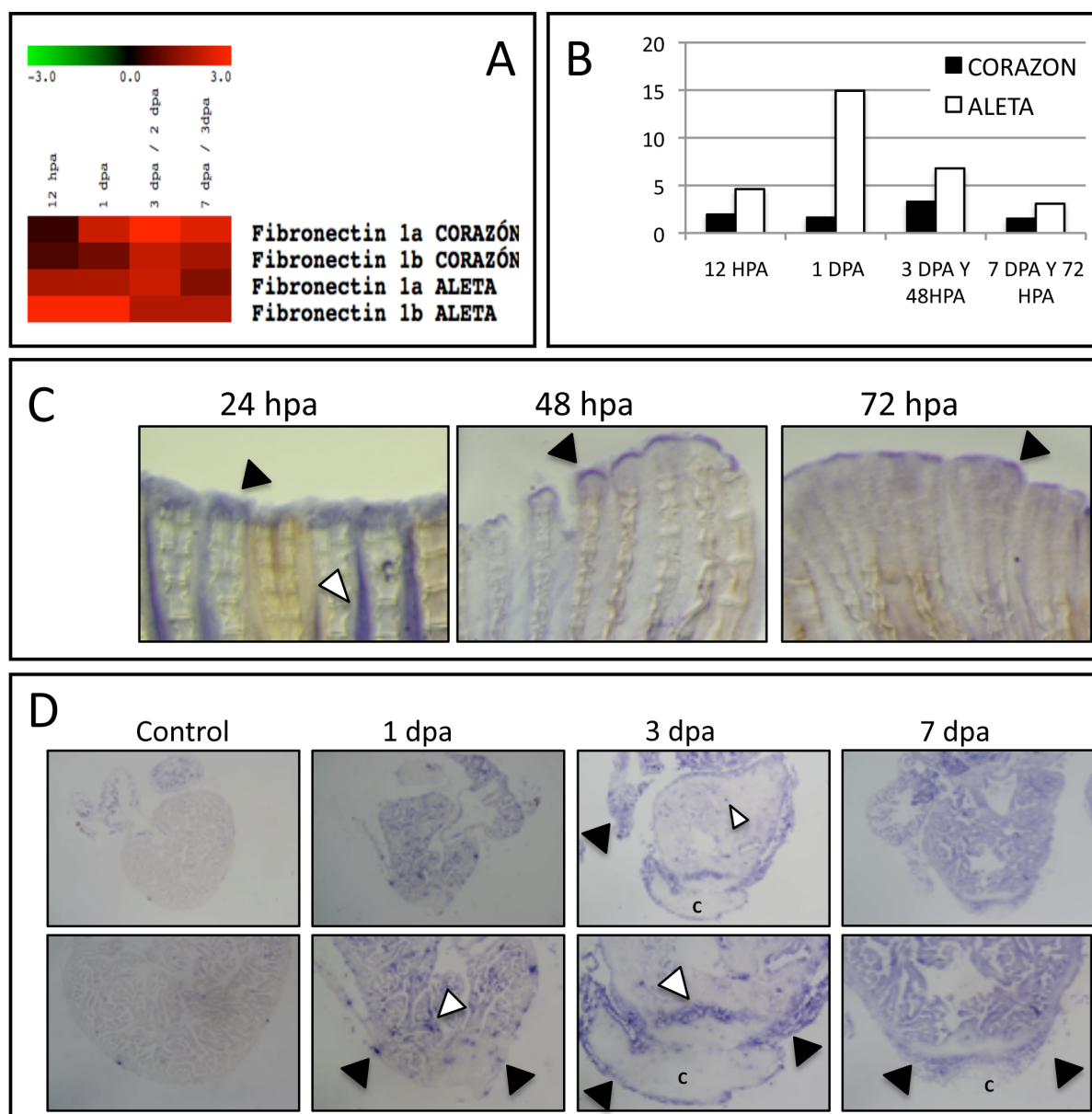


Figura 15. La transcripción de Fibronectina 1b (fn1b) aumenta durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Cuadro donde se muestran los resultados del análisis de los microarrays. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. La transcripción de fibronectina 1a y fibronectina 1b está aumentada en todos los tiempos. Los cambios están expresados en base logarítmica. (B) PCR cuantitativa de fn1b. Su transcripción está aumentada en todos los tiempos analizados (12, 24, 48 y 72 hpa en el caso de las aletas y 12 hpa, 1, 3 y 7 dpa en el caso de la regeneración del corazón). (C) Patrón de expresión de fibronectina 1b durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa. (D) Patrón de expresión de fn1b durante la regeneración del corazón a 1, 3 y 7 dpa (c=coágulo sanguíneo).

de la respuesta reparadora y la inflamación en tras infarto de miocardio en mamíferos (Dobaczewski et al., 2010) y en el cierre de las heridas (Widgerow, 2011).

Validamos por PCR cuantitativa el aumento de expresión de *fn1b* durante la regeneración de la aleta y el corazón. Al igual que vimos en el microarray, la expresión de ambas estaba muy aumentada en los dos procesos regenerativos

(Figura 15B) (La expresión de *fn1a* también estaba aumentada pero no se muestra el resultado de la PCR cuantitativa). A continuación, analizamos el patrón de expresión de *Fnlb* mediante ISH, durante ambos procesos. Durante la regeneración de la aleta *Fnlb* se transcribía a 24 hpa por toda la zona regenerada (distal al plano de amputación) así como en los espacios interradales (Figura 15C). Posteriormente a 48

Resultados

hpa su expresión se había restringido a la parte más distal del blastema de los radios, justo por debajo de la epidermis, donde se mantenía su expresión a 72 hpa (Figura 15C).

Durante la regeneración del corazón detectamos la expresión de *fn1b* desde 1dpa y hasta 7dpa. A 1dpa se expresaba de manera punteada por todo el endocardio y el epicardio del corazón aunque se detectó cierta tendencia a concentrarse cerca de la zona de amputación (Figura 15D). También se observaba expresión en la zona del coágulo. A 3dpa la expresión

se detectaba por todo el epicardio y en el endocardio más cercano al plano de amputación. También se observaba en la capa más externa del coágulo y en alguna célula aislada en el interior del ventrículo (Figura 15D). A 7dpa la expresión decaía y se restringía al endocardio más próximo a la zona dañada así como al coágulo de la herida que aún no había sido reabsorbido (Figura 15D).

Otro de los genes de interés fue *integrina alpha V (itga5)*. Las integrinas son proteínas transmembrana y están implicadas

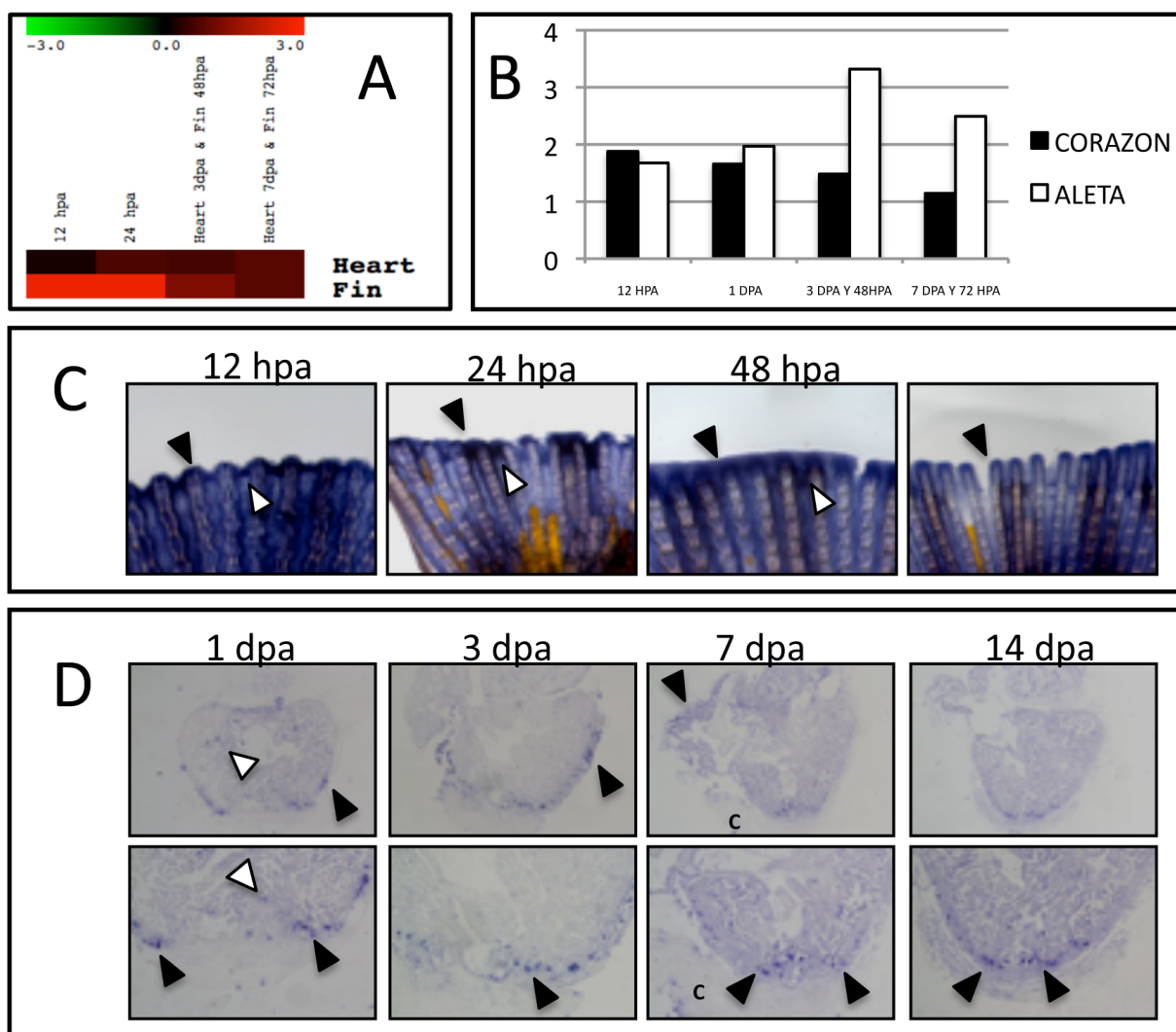


Figura 16. Integrina alfa 5 (*itga5*) aumenta su expresión durante la regeneración del corazón y de la aleta. (A) Cuadro donde se muestran los resultados del análisis de los microarrays. En todas las agrupaciones la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. La transcripción de *itga5* está aumentada en todos los tiempos en relación con el control. Los cambios están en base logarítmica. (B) PCR cuantitativa de *itga5*. Al igual que en el microarray, su transcripción está aumentada en todos los tiempos analizados (12, 24, 48 y 72 hpa en el caso de las aletas y 12 hpa, 1, 3 y 7dpa en el caso de la regeneración del corazón). (C) Patrón de expresión de *itga5* durante la regeneración de la aleta a 12 hpa y 1, 2 y 3 dpa. (D) Patrón de expresión de *itga5* durante la regeneración del corazón a 1, 3, 7 y 14 dpa (c=coágulo sanguíneo).

en la interacción célula –célula y célula-matriz extracelular. En mamíferos existen 18 subunidades α y 8 subunidades β que pueden dimerizar, formando hasta 24 heterodímeros distintos (Hynes, 2002). La unión de ligandos a integrina dispara señales desde el exterior al interior celular y viceversa, y regula distintos procesos dependientes de anclaje incluyendo migración, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Hynes, 2002; Takada et al., 2007). Integrina αV se puede unir a cinco subunidades β distintas ($\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ o $\beta 8$) y reconocen ligandos que contienen Arg-Gly-Asp como fibronectina, vitronectina y osteopontina (Hynes, 2002; Takada et al., 2007). Itg $\alpha 5$ se une a fn1 y ambas están implicadas en el cierre de heridas (Bass et al., 2011). En el pez cebra se ha demostrado que durante el desarrollo itg $\alpha 5$ es necesaria para el mantenimiento de los límites entre somitos (Koshida et al., 2005) así como para el ensamblaje de la matriz extracelular en los límites entre tejidos a lo largo del cuerpo (Julich et al., 2009), y en la gastrulación para regular la asimetría corporal (Ablooglu et al., 2010). Además, en ajolote se ha visto que durante la regeneración de la extremidad se induce su expresión (Tsonis et al., 1997). También en pez cebra se ha visto que se induce su expresión durante la regeneración del nervio óptico (McCurley and Callard, 2010) y que se requiere para la remodelación de la vasculatura durante el desarrollo (van der Flier et al., 2010).

Validamos los resultados del análisis de microarrays mediante PCR cuantitativa y vimos que eran muy similares (Figura 16A y Figura 16B). Mediante ISH obtuvimos el patrón de expresión de itg $\alpha 5$ durante la regeneración de la aleta y del corazón (Figura 16C y Figura 16D). En el primer caso encontramos, tal y como nos indicaban tanto los resultados de los microarrays como los de PCR cuantitativa, que la expresión de itg $\alpha 5$ aumentaba a 12 hpa y se mantenía al menos hasta las 72 hpa. A 12 hpa se expresaba por toda la epidermis de la herida. A 24 hpa al igual que fn1b, itg $\alpha 5$ se expresaba a lo largo de la zona distal al plano de amputación así como en el espacio interradianal subyacente (Figura 16C). A partir de las 24 horas y hasta las 72 hpa, itg $\alpha 5$ se expresaba tanto en la zona que da lugar al

blastema, como en la zona más adyacente a los radios esqueléticos en formación/regeneración.

En el corazón vimos que itg $\alpha 5$ se expresaba a 1dpa en los márgenes de la zona amputada en el miocardio compacto y en el límite o la unión entre el coágulo sanguíneo y el epicardio. También se transcribía en algunas células aisladas del miocardio y del endocardio en el interior del ventrículo. El patrón de expresión en el miocardio compacto no era ni uniforme ni continuo y aparecía como puntos o áreas aisladas entre sí (Figura 16D). Este patrón nos recordó mucho al que hemos descrito anteriormente para *nlb*. A 3dpa se mantenía este mismo patrón aunque se restringía en el endocardio y miocardio a los márgenes de la zona de la herida mientras. En el epicardio sin embargo se mantenía la expresión a lo largo de todo el órgano de manera punteada (Figura 16D). Posteriormente, a 7dpa y 14dpa, disminuía el dominio de expresión de itg $\alpha 5$ y quedaba restringida la expresión al límite entre el ventrículo sano y el ventrículo en regeneración (Figura 16D). En cualquier caso era un patrón punteado y no continuo y muy similar al de el de *fn1b* (Figura 15D).

Otro de los genes relacionados con la ECM que identificamos en el microarray fue *periostin*. La expresión de periostin estaba alterados en todos los tiempos a lo largo de la regeneración, tanto del corazón como de la aleta (Figura 6A). Nos llamó la atención que para los dos primeros tiempos analizados en cada proceso regenerativo, la expresión de *periostin* disminuía frente al control para después aumentar en los 2 siguientes puntos. Es decir, veíamos una represión de la expresión en los dos primeros tiempos para después, en los dos siguientes, ver una inducción.

Periostin es una proteína secretada de 90kDa implicada en adhesión y que se expresa en el periosteum del hueso, el ligamento peridontal, en células metastáticas de cáncer, en vasos dañados, y en células que están en transición epitelio-mesénquima (TEM) (Snider et al., 2009). Como proteína de la ECM que se asocia a áreas de fibrogénesis,

Resultados

ya sea ésta patológica o no, puede interactuar directamente con otras proteínas de la ECM como fibronectina, Tenascin-C, colágeno I/V y heparina. Además, puede servir de ligando para algunas integrinas y afectar a la capacidad migratoria de células cancerígenas y de hacer TEM (Snider et al., 2009). En mamíferos se ha observado que periostin induce la re-entrada en ciclo de cardiomiocitos diferenciados a través de la unión a integrinas y la señalización por PI3K y tras un infarto, mejora sensiblemente la remodelación ventricular, y hay una mayor angiogénesis (Dobaczewski et al., 2010; Kuhn et al., 2007; Snider et al., 2009). Recientemente, se ha observado que su expresión aumenta tras infarto de miocardio tanto en seres humanos como en ratones y que los ratones deficientes en *periostin* tienen dañada la respuesta reparadora (Shimazaki et al., 2008). Estos ratones mutantes muestran ruptura cardíaca como consecuencia

de una menor rigidez miocárdica. Este menor rigidez se debe a un menor número de células positivas para alfa actina de músculo liso, la formación deficiente de fibras de colágeno y a una reducida fosforilación de FAK (Shimazaki et al., 2008). En pez cebra, periostin se ha implicado en adhesión y diferenciación de fibras musculares (Kudo et al., 2004). También se ha visto en estudios parecidos al nuestro, que su transcripción aumenta durante la regeneración de la aleta (Padhi et al., 2004) y el corazón (Padhi et al., 2004; Sleep et al., 2010).

Hemos analizado mediante ISH el patrón de expresión de *periostin* durante la regeneración de la aleta y el corazón. Durante la regeneración de la aleta no detectábamos *periostin* hasta las 48hpa (Figura 17B), cuando se observaba en la zona del blastema por encima de los radios esqueléticos. A 3dpa se expresaba en el blastema distal, así como en el borde o frontera que limita

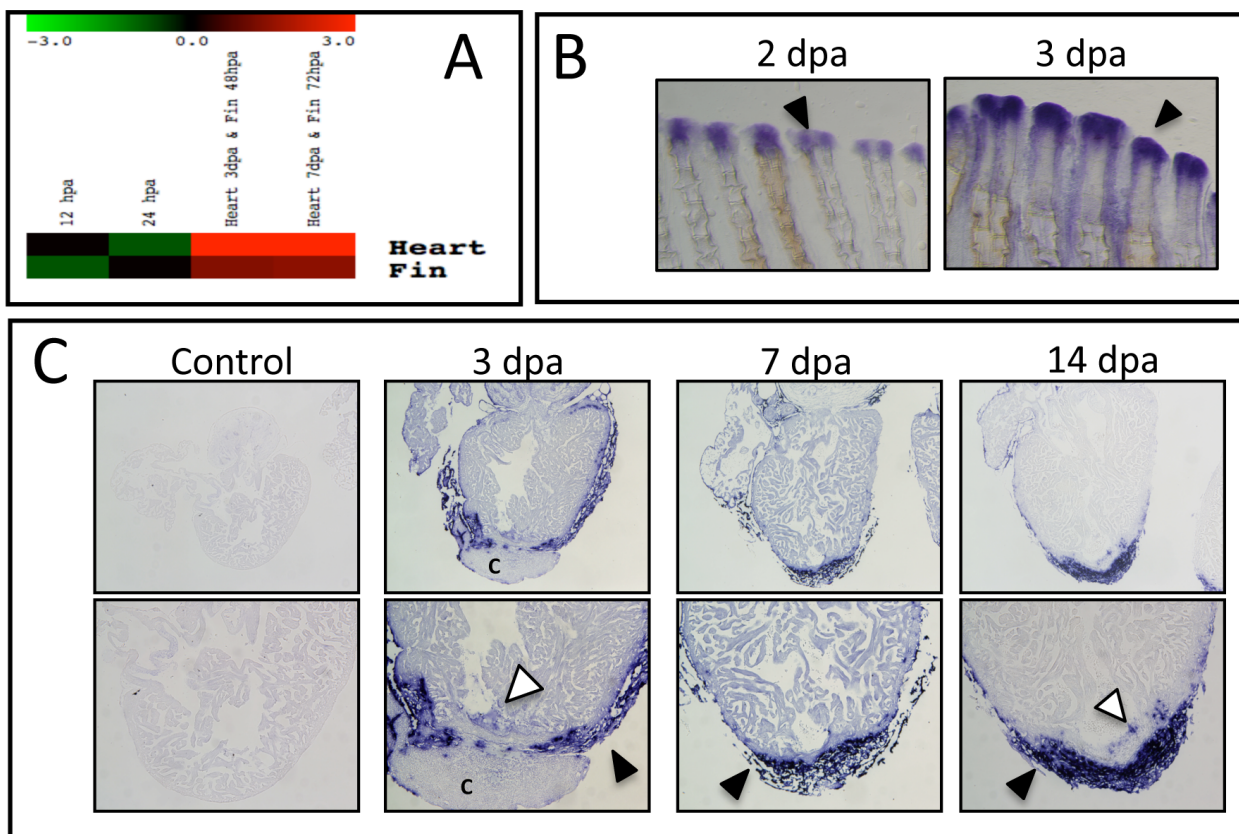


Figura 17. Periostin se expresa durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Cuadro donde se muestran los resultados del análisis de los microarrays. La transcripción de *periostin* está disminuida en los dos primeros tiempos y aumentada en los dos últimos. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas las agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. (B) Patrón de expresión de *periostin* durante la regeneración de la aleta a 2 y 3 dpa. (C) Patrón de expresión de *periostin* durante la regeneración del corazón a 3, 7 y 14 dpa (c=coágulo sanguíneo).

los radios y los inter-radios. Esta expresión se extendía por debajo del plano de amputación hasta una distancia equivalente a un segmento esquelético del plano de amputación.

Durante la regeneración del corazón detectamos *periostin* desde 3dpa hasta 14dpa (Figura 17C). A 3dpa observábamos una expresión muy fuerte a lo largo de todo el epicardio que rodea las dos cámaras del corazón, así como en parte del coágulo sanguíneo. A

7dpa, la expresión se restringía a la zona de amputación y epicardio de ambas cámaras el dominio de expresión se restringía (Figura 17C). A 3dpa se detectaba en varias capas celulares, mientras que a 7dpa se observaba sólo en la más exterior. A 14 dpa el patrón de expresión de *periostin* se mantenía, a la vez que se extendía hacia en interior de la zona dañada (Figura 17C).

Otro de los genes relacionados con la

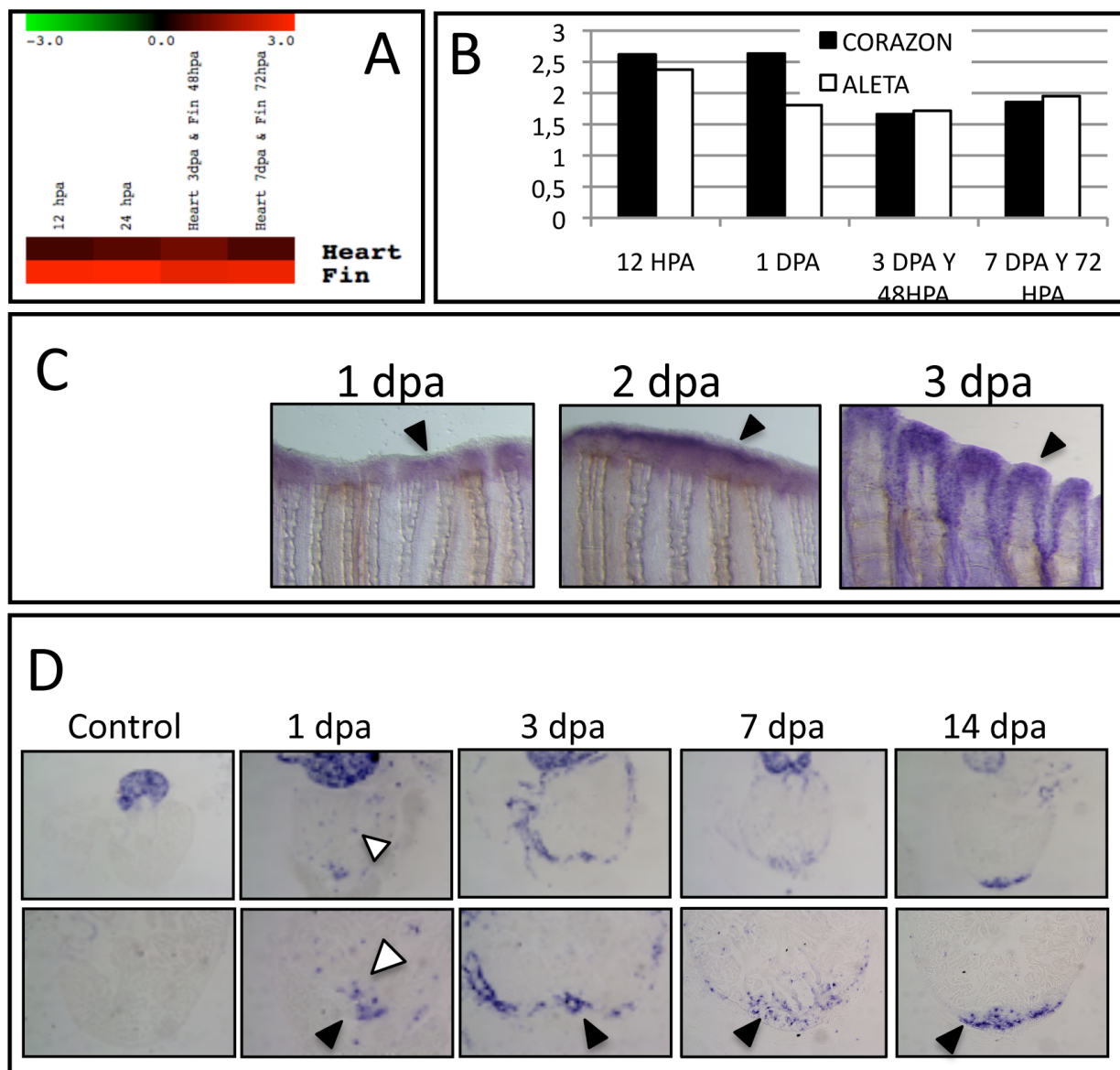


Figura 18. La transcripción del factor de crecimiento del tejido conectivo (connective tissue growth factor o ctgf) aumenta durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Resultados del análisis de los microarrays. La transcripción de ctgf e aumenta tanto en la regeneración de la aleta como del corazón. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. **(B)** PCR cuantitativa de ctgf. Los niveles de transcripción están aumentados en todos los tiempos analizados. **(C)** Patrón de expresión de ctgf durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa. Se expresa en el blastema a partir de las 24 hpa. **(D)** Patrón de expresión de ctgf durante la regeneración del corazón a 1, 3, 7 y 14 dpa.

ECM que despertó nuestro interés fue el *factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF o CNN2)*. Ctgf es una proteína asociada a la ECM que se une a integrinas, fibronectinas, proteoglicanos unidos a heparan-sulfato como los syndecans, proteínas relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 6 (LRP1 y LRP6) y el receptor tirosina kinasa del factor de crecimiento nervioso (TrkA) (Luft, 2008; Moussad and Brigstock, 2000). Ctgf juega un papel en angiogénesis, condrogénesis y reparación de heridas mediante su participación en proliferación, migración y diferenciación (Luft, 2008). Su expresión aumenta tras producirse una herida y esta implicado en la formación del tejido granuloso, re-epiteliarización y formación y remodelación de ECM en varios procesos fibróticos incluyendo el corazón (Barrientos et al., 2008; Daniels et al., 2009). En un trabajo muy similar al nuestro se ha descrito que los niveles del mensajero de *ctgf* aumentan durante la regeneración del corazón en el pez cebra (Lien et al., 2006).

Hemos validado mediante PCR cuantitativa e ISH los resultados del análisis de los microarrays (Figura 18A). La PCR cuantitativa mostró que al igual que con el microarray, los niveles de transcripción de *ctgf* estaban aumentados durante los procesos regenerativos (Figura 18A). Al analizar mediante ISH el patrón de expresión durante la regeneración de la aleta observamos que *ctgf* se expresaba desde 1 dpa. A 1 dpa se expresaba en la zona del blastema por encima de los radios esqueléticos (Figura 18C). A 2 dpa se expresaba por todo el blastema pero su expresión era más fuerte por debajo de la epidermis de la herida (Figura 18C). A 3 dpa vimos que se expresaba en el blastema distal y en la zona interradyal, en el tejido conectivo más cercano o en contacto con los radios esqueléticos (Figura 18C).

Durante la regeneración del corazón *ctgf* se expresaba a 1 dpa en células aisladas dispersas por todo el corazón, aunque se concentraban en mayor número en la zona de amputación (Figura 18D). A 3 dpa desaparecía casi por completo la expresión en células aisladas en el interior del ventrículo y pasaba a expresarse a por todo el

epicardio y en el endocardio más próximo al plano de amputación (Figura 18D). A 7 dpa la expresión en el epicardio quedaba restringida a los márgenes de la zona de la herida y se seguían observando algunas células epicárdicas alejadas del plano de amputación. En la zona de la herida se expresaba, aparte de en células aisladas del endocardio y miocardio, también en células dentro del coágulo. Finalmente, a 14 dpa la expresión se restringía a la zona en regeneración, observándose en todos los tejidos implicados (Figura 18D). Este patrón de expresión nos recordó mucho a los anteriormente descritos para *fn1b* e *itga5*.

El último de los genes relacionado con la ECM en el que centramos nuestra atención fue *keratina 18*. Keratina 18 forma junto con keratina 8 los filamentos intermedios de los epitelios monoestratificados (Hutton et al., 1998). Se ha descrito que su transcripción aumenta en el pez cebra durante la regeneración de la aleta (Padhi et al., 2004) y durante la regeneración del nervio óptico (McCurley and Callard, 2010). También se ha demostrado su implicación e importancia durante la regeneración de la extremidad en tritón (Corcoran and Ferretti, 1997), donde la inyección de oligonucleótidos antisentido contra ella en células del blastema en cultivo induce cambios morfológicos y hace disminuir la síntesis de ADN.

Analizamos por PCR cuantitativa la transcripción de *keratina 18* durante la regeneración de la aleta y del corazón (Figura 19B). Vimos que a 12 y 24 hpa su expresión estaba muy aumentada con respecto al control, tal y como habíamos visto en los resultados de los microarrays. Aunque posteriormente (2 y 3 dpa en el caso de la aleta y 3 y 7 dpa en el caso del corazón) su expresión disminuía, todavía estaba muy por encima de la transcripción basal que mostraban los controles. A continuación, analizamos su patrón de expresión durante ambos procesos mediante ISH. En la aleta, *keratina 18* se expresaba a 24 hpa por toda la zona regenerada (distal al plano de amputación) y en la zona interradyal por debajo del plano de amputación (Figura 19C). Este patrón de expresión era muy similar al de *fn1b* e *itga5*.

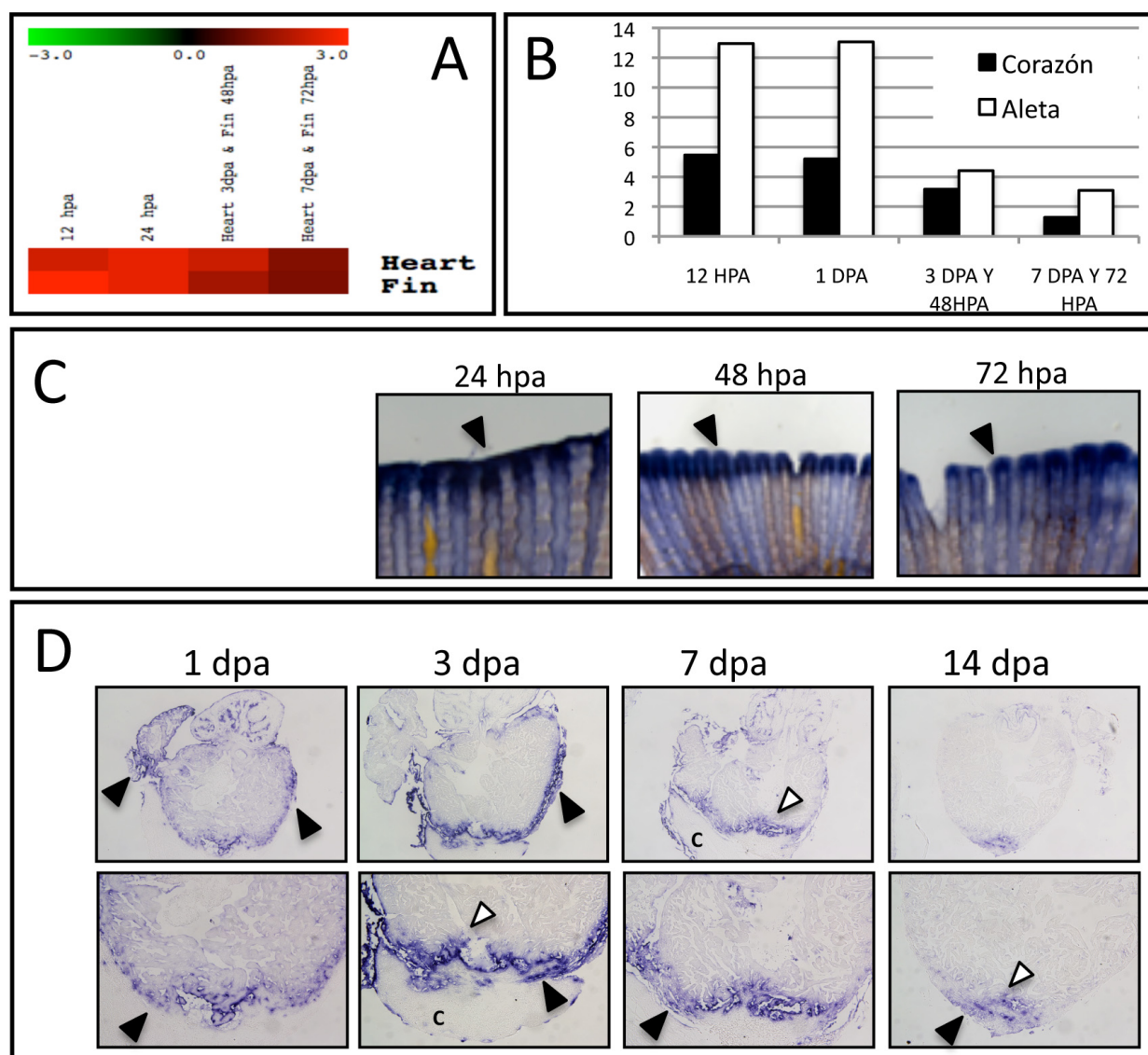


Figura 19. La expresión de Keratina 18 aumenta durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Cuadro donde se muestran los resultados del análisis de los microarrays. La transcripción de keratina 18 aumenta en todos los tiempos (expresado en base logarítmica). En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. (B) PCR cuantitativa de keratina 18. Al igual que en el microarray, su transcripción están aumentada en todos los tiempos analizados (12, 24, 48 y 72 hpa en el caso de las aletas y 12 hpa, 1, 3 y 7dpa en el caso de la regeneración del corazón). (C) Patrón de expresión de keratina 18 durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa. (D) Patrón de expresión de keratina 18 durante la regeneración del corazón a 1, 3, 7 y 14 dpa (c=coágulo sanguíneo).

A 2 dpa se expresaba en la zona del blastema distal y en la zona límite entre el blastema de los radios y la zona interradianal. A 3dpa se mantenía la expresión se restringía a esta zona y a la parte distal del blastema (Figura 19C).

Durante la regeneración del corazón *keratina 18* se transcribía desde 1 dpa hasta al menos 14 dpa. A 1dpa se expresaba en el endocardio más cercano a la zona amputada (Figura 19D). También por todo el endotelio (no pudimos determinar si se trataba de endocardio

o del endotelio de los vasos coronarios), en el endotelio del bulbo arterial y en el epicardio de la aurícula. A 3dpa desaparecía la expresión de *keratina 18* en el endocardio de la aurícula y en endotelio del bulbo arterial, pero se expandía por todo el epicardio del ventrículo (Figura 19D). En el endocardio del ventrículo *keratina 18* se restringía a la zona más cercana al plano de amputación. También detectamos expresión en la parte más externa del coágulo. A 7 dpa disminuía mucho la expresión en el epicardio y

Resultados

se mantenía en la parte más externa del coágulo (Figura 19D). En el endocardio, únicamente se observaba expresión en la zona dañada. Finalmente a 14 dpa, que fue el tiempo más tardío que analizamos, *keratina 18* se detectaba únicamente en el endocardio de la zona dañada (Figura 19D).

3.2 Genes relacionados con la señalización celular: JunB , Hyou1, raldh2, midkine-a y caveolina-1.

A continuación, quisimos validar algunos de los genes comunes a los dos procesos identificados en el microarray que estuviesen implicados en señalización.

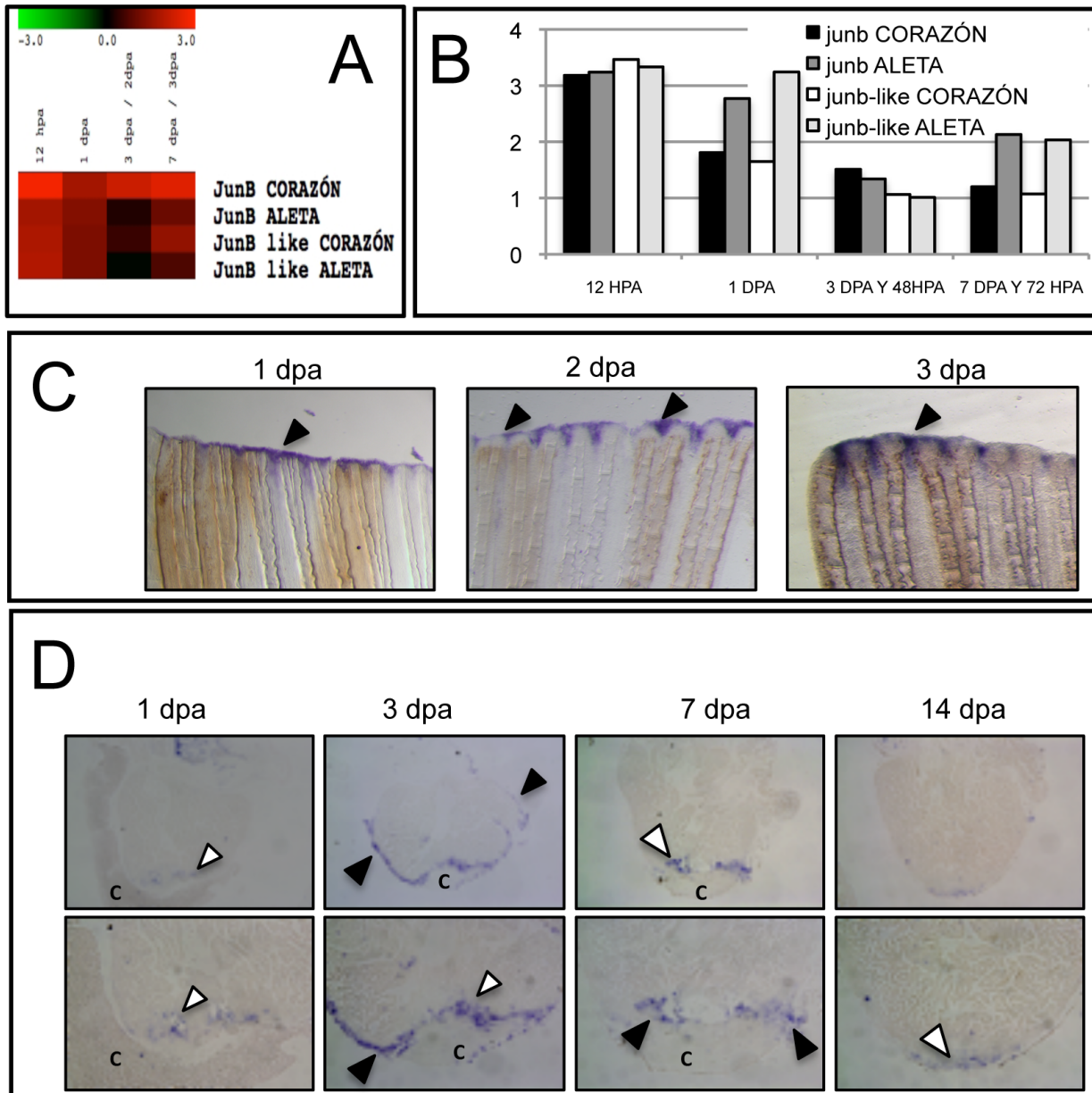


Figura 20. La transcripción de *junB* y *junB-like* aumenta durante la regeneración de la aleta y del corazón . (A) Cuadro donde se representan los resultados del análisis de los microarrays. La transcripción de *junB* y *junB-like* aumentan durante la regeneración del corazón y de la aleta. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. **(B)** PCR cuantitativa de *junB* y *junB-like* durante la regeneración. La transcripción de ambos genes aumenta en todos los tiempos analizados **(C)** Patrón de expresión de *junB* durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa. **(D)** Patrón de expresión de *junB-like* durante la regeneración del corazón a 1, 3, 7 y 14 dpa (c=coagulo sanguíneo).

Dos de estos genes eran *junB* y *junB-like*. Las dos proteínas pertenecen al complejo Activating Protein 1 (AP-1), un factor de transcripción dimérico formado por varias proteínas de distintas familias cuyo denominador común es un dominio de cremallera básica de leucina (bZIP) esencial para la dimerización y unión a ADN (Shaulian, 2010). *JunB* puede funcionar como un oncogén o como un gen supresor de tumores dependiendo del contexto celular donde se encuentre (Piechaczyk and Farras, 2008; Shaulian, 2010). Recientemente se ha visto en pez cebra que *junB* se requiere para la mantener la estructura de los discos Z de las fibras cardíacas y que su ausencia da lugar a fallo cardíaco (Meder et al., 2010). También se ha descrito recientemente el requerimiento funcional de *junB* durante la regeneración de la aleta (Ishida et al., 2010), aunque se sabía desde hace algún tiempo que los niveles de transcripción tanto de *junB* como *junB-like* aumentaban durante la regeneración de la aleta y del corazón (Lien et al., 2006; Schebesta et al., 2006; Sleep et al., 2010; Yoshinari et al., 2009).

Hemos validado los resultados del microarray mediante PCR cuantitativa e ISH (Figura 20). Los resultados que obtuvimos con la PCR cuantitativa indicaban que el aumento de expresión de *JunB* era algo mayor que el de *junB-like* durante la regeneración de la aleta y durante la del corazón (Figura 20B). Por ello analizamos a continuación el patrón de expresión de *JunB* durante la regeneración de la aleta y el corazón (Figura 20C y Figura 20D). Durante la regeneración de la aleta se expresaba en la epidermis de la herida desde 1 dpa hasta 3 dpa. También se expresaba en la zona interradianal donde se expresa *activinaA* (Jazwinska et al., 2007)(Figura 20C).

Al analizar el patrón de expresión de *junB* durante la regeneración del corazón observamos que se expresaba a partir de 1 dpa en la zona de la herida en la parte de contacto entre el endocardio expuesto y el coágulo sanguíneo (Figura 20D). A 3 dpa aparecía también en la zona de contacto entre el coágulo y el epicardio más próximo a la zona de amputación. A 7 dpa desaparecía del

epicardio y se expresaba únicamente en la zona del coágulo más cercana al endocardio de la zona de la herida. Finalmente a 14 dpa vimos que su expresión quedaba confinada a la parte más externa de la pared del ventrículo de la zona amputada (Figura 20D).

Otro gen interesante que decidimos validar fue *Hipoxia up-regulated gene 1* (*Hyou1*), también llamada proteína 150 regulada por oxígeno (*ORP150*). *Hyou1/* *ORP150* es una proteína de 150kDa asociada al retículo endoplásmico (RE) que funciona como chaperona en el plegamiento y maduración de otras proteínas (Ng et al., 2007). Se induce específicamente por hipoxia, y no lo hace por otros tipos de estrés (Ng et al., 2007). Está involucrada en la protección frente al daño por hipoxia y al estrés del RE y al reducirse su expresión mediante oligonucleótidos antisentido se aumenta la susceptibilidad al daño por hipoxia en los fagotitos mononucleares (Tsukamoto et al., 1996). *Hyou1* que acelera el cierre, la neovascularización y la reparación de heridas mediante la modulación del transporte intracelular de *Vegf* (Ozawa et al., 2001). Además en ratas atenúa los daños en el miocardio tras isquemia/reperfusión inhibiendo la apoptosis de los cardiomiocitos y preservando la función contráctil (Aleshin et al., 2005).

Hemos validado mediante PCR cuantitativa e ISH los resultados obtenidos en el microarray. Mediante la primera técnica hemos visto que al igual que en el microarray la transcripción de *hyou1* aumenta mucho en el corazón a las 12 hpa (hasta alrededor de 4,75) para después disminuir paulatinamente a lo largo del tiempo. Durante la regeneración de la aleta, sin embargo vimos que su expresión tenía una tendencia a aumentar progresivamente (Figura 21B).

Mediante ISH hemos obtenido el patrón de expresión durante la regeneración de la aleta y del corazón. En la aleta, *Hyou1* se expresaba en el blastema desde 1 dpa y hasta 3 dpa cuando aparecía confinada al blastema distal (Figura 21C). A 1 dpa se expresaba por toda la zona en regeneración mientras que a 2 dpa su expresión

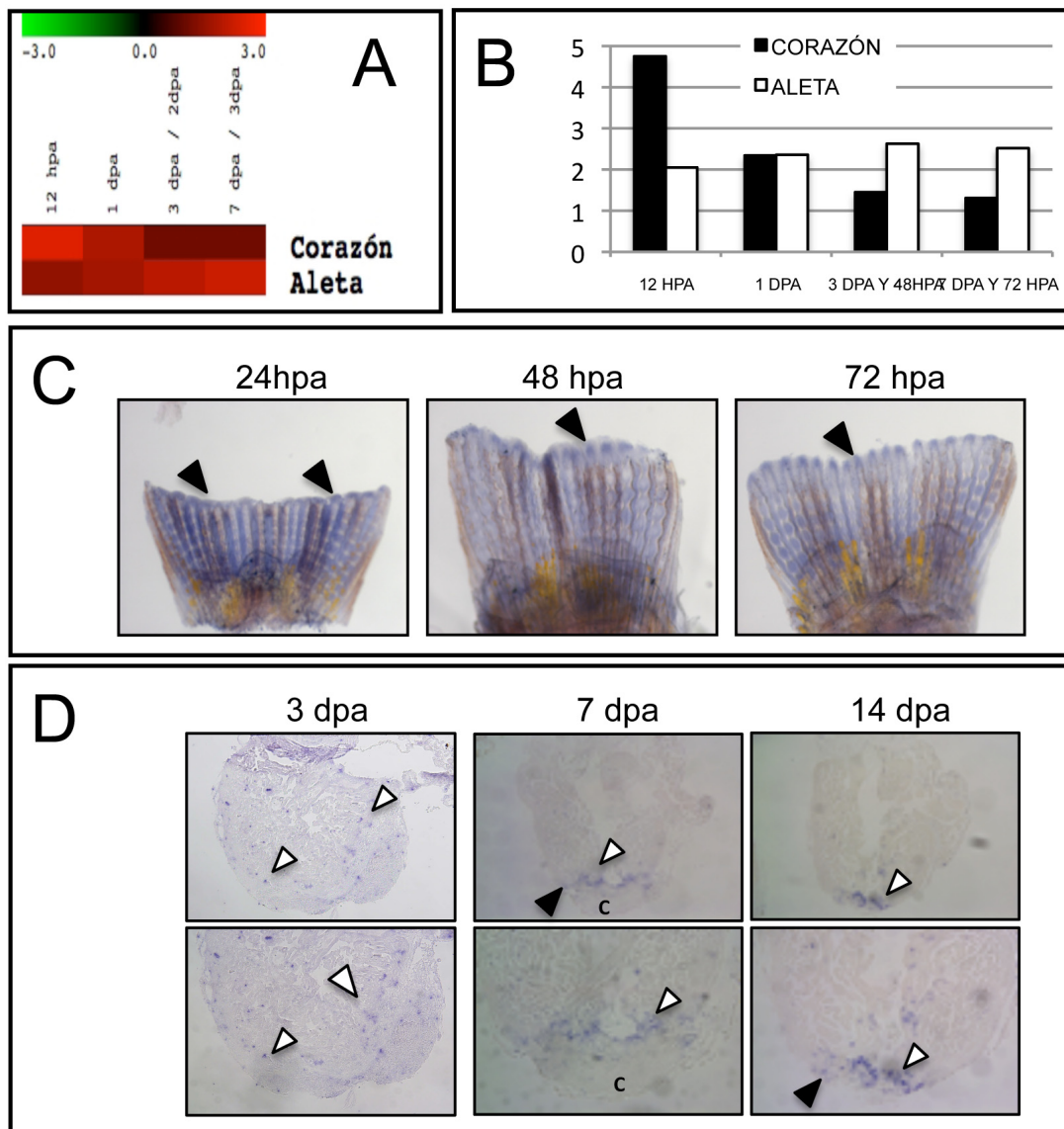


Figura 21. Hipoxia up-regulated gene 1 (Hyou1) se expresa durante la regeneración del corazón y de la aleta. (A) Resultados del análisis de los microarrays. La transcripción de *hyou1* aumenta tanto en la regeneración de la aleta como del corazón. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. (B) PCR cuantitativa de *hyou1*. Su transcripción e aumenta en todos los tiempos analizados. (C) Patrón de expresión de *hyou1* durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa. Se expresa en el blastema a partir de las 24 hpa. (D) Patrón de expresión de *hyou1* durante la regeneración del corazón a 1, 3, 7 y 14 dpa (c=coágulo sanguíneo).

quedaba restringida al blastema (Figura 21C).

Durante la regeneración del corazón observamos que *Hyou1* se expresaba a partir de 3 dpa en células aisladas por todo el corazón, de manera parecida a como lo hacían *itga5* o *ctgf*. Posteriormente, a 7 dpa únicamente se expresaba en algunas células dentro del coágulo y en la zona de contacto entre este y el miocardio. A 14 dpa se expresaba en células que se encuentran en el coágulo o la ECM que se ha formado en sustitución de este. También se expresaba

en células aisladas del endocardio del área en regeneración (Figura 21D).

Otro de los genes que identificamos en el análisis de los resultados obtenidos con los microarrays fue *retinaldehído deshidrogenasa 2* (*aldh1a2* o *raldh2*) descrito en la introducción. Hemos validado los resultados del microarray mediante ISH. Durante la regeneración de la aleta, *raldh2* se expresaba a 1 dpa en el blastema. A 2 dpa su expresión estaba restringida al blastema distal. A 3 dpa su expresión desaparecía

casi por completo y quedaba confinada al área más central del blastema distal de los radios, por debajo de la epidermis (Figura 22B).

Durante la regeneración del corazón, *raldh2* se expresaba desde 1dpa y hasta 14dpa (Figura 22C). A 1dpa se expresaba en el epicardio de la aurícula y de manera discontinua por el endocardio de la zona de amputación. Posteriormente, a 3dpa, la expresión se extendía

por el epicardio y, en la zona de la herida, por todo el endocardio. A 7dpa se mantenía el mismo patrón de expresión observado a 3 dpa, aunque era aún más evidente la expresión por todo el epicardio. A 14 dpa este patrón se restringía al endocardio de la zona más cercana o proximal al plano de amputación (Figura 22C).

Debido al importante papel que *raldh2* juega en el desarrollo del epicardio y del corazón

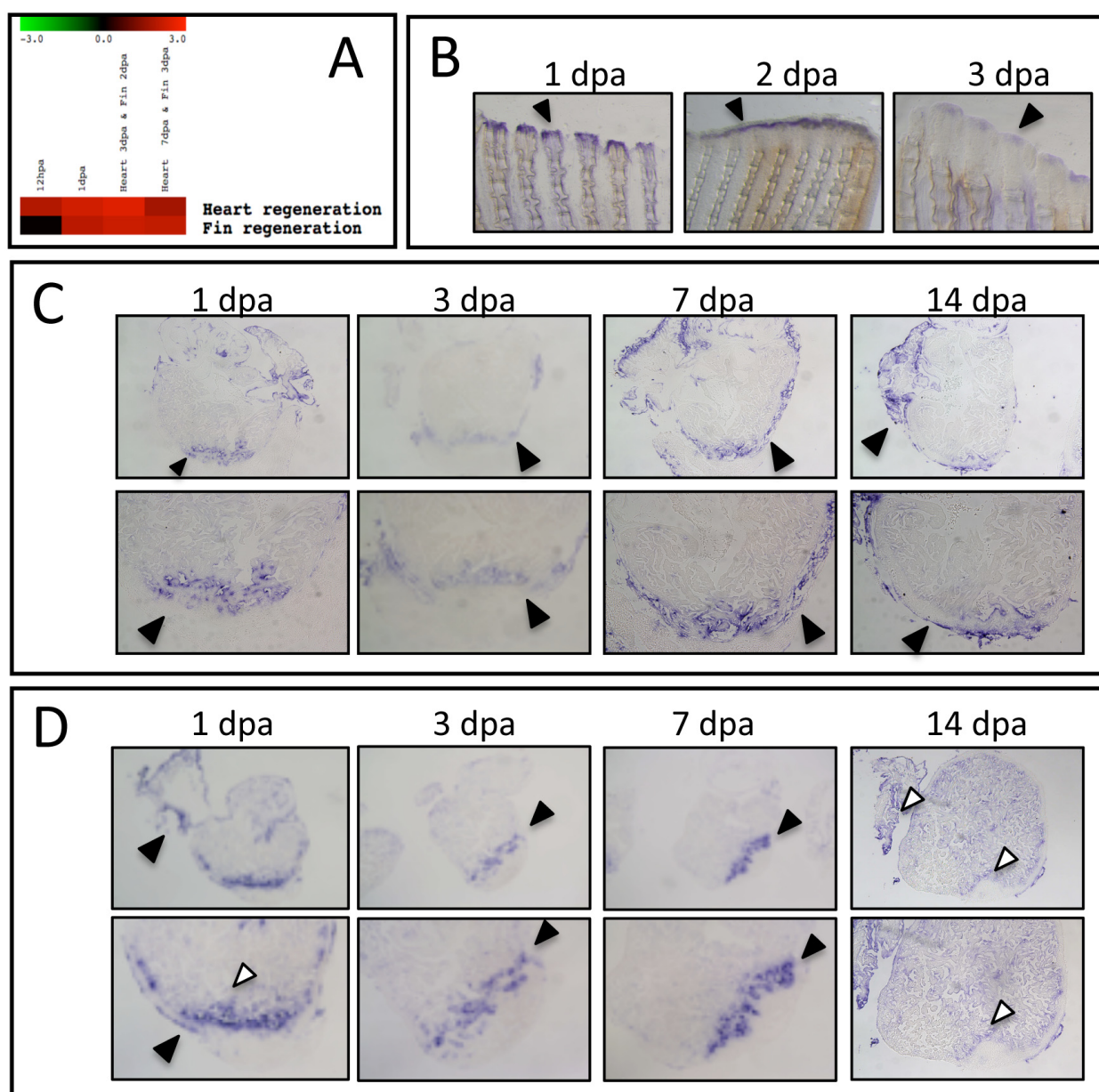


Figura 22. Raldh2 se expresa durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Resultados del análisis de microarrays. La transcripción de *raldh2* aumenta durante la regeneración de la aleta y del corazón. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. (B) Patrón de expresión de *raldh2* durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa. (C) Patrón de expresión de *raldh2* durante la regeneración del corazón en el modelo de amputación a 1, 3, 7 y 14 dpa. (D) Patrón de expresión de *raldh2* durante la regeneración del corazón en el modelo de crioinfarto a 1, 3, 7 y 14 dpa.

(Niederreither et al., 2001; Perez-Pomares et al., 2002), quisimos también analizar que ocurría con la expresión de *raldh2* durante la regeneración del corazón en el modelo de crioinfarto. Para ello crioinfartamos peces control y analizamos mediante ISH el patrón de expresión de *raldh2*. *Raldh2* se expresaba al menos a partir de 6 horas después del crioinfarto (6 hpi) y por lo menos hasta 14 días después (14 dpi) (Figura 22D). A 6 hpi, vimos expresión en el epicardio de las dos cámaras del corazón. A 1 dpi se veía por todo el epicardio del corazón (con más intensidad que a 12 hpi y a 6 hpi) y en el endocardio de la zona dañada. A 3dpi, la expresión de *raldh2* había desaparecido del epicardio casi por completo y se mantenía en el endocardio de la zona del corazón más próxima al área infartada. Este patrón se mantenía a 7 dpi aunque el área que expresaba era algo mayor que a 3 dpi (Figura 22.D).

Un gen relativamente poco conocido que nos interesó fue *midkine-a* (*mdka*). *Mdka* es uno de los dos genes *midkine* (existen *mdkay mdkb*) resultantes de una duplicación del genoma en pez cebra, muy similares en secuencia y que se expresan de manera distinta y con funciones distintas (Liedtke and Winkler, 2008; Schafer et al., 2005; Winkler and Moon, 2001; Winkler et al., 2003). Mdk es una citoquina o factor de crecimiento que se une a heparan sulfato y que tiene un peso molecular de 13 kDa y tiene un 50% de identidad con pleiotropina (Muramatsu, 2010). Mdk se une a estructuras supersulfatadas de heparan y condroitina sulfatos y su receptor o receptores forman un complejo molecular que contiene proteoglicanos (Muramatsu, 2010). Entre los receptores que unen *mdka* encontramos integrinas (Muramatsu et al., 2004), syndecans (Mitsiadis et al., 1995), LRP1 (Muramatsu et al., 2000), protein tyrosine fosfatasa-z (PTPz) (Maeda et al., 1999), versican (Zou et al., 2000) *midkine*, binds to a chondroitin sulfate pro, glypican-2 (Kurosawa et al., 2001) y neuroglycan (Ichihara-Tanaka et al., 2006). Mdk promueve el crecimiento, la supervivencia, la migración y la expresión génica en diferentes células diana y se ha implicado en reproducción, reparación de daño y juega un papel en la patología de varias enfermedades (revisado en (Muramatsu, 2010).

Durante el desarrollo embrionario la expresión de *mdk* está regulada tanto temporalmente como espacialmente, y en el adulto es muy débil o está ausente de la mayoría de los tejidos (Muramatsu, 2010). Sin embargo, su expresión se induce muy rápidamente en tejidos dañados, especialmente después de una isquemia en vasos sanguíneos, la corteza cerebral y el miocardio y tiene dos efectos: el aumento de la inflamación y la promoción de la supervivencia y la reparación (Muramatsu, 2010) Aichi Gakuin University. 12 Araiike, Aichi, Jap. En pez cebra, *mdk* participa en la neurogénesis (Liedtke and Winkler, 2008; Schafer et al., 2005; Winkler and Moon, 2001; Winkler et al., 2003) y también se ha descrito el aumento de su expresión durante la regeneración de la aleta en el adulto (Jazwinska et al., 2007; Schebesta et al., 2006), en la larva (Mathew et al., 2009), durante la regeneración del corazón (Lien et al., 2006) y durante la regeneración de la retina (Calinescu et al., 2009; Qin et al., 2009).

Hemos analizado el patrón de expresión de *mdka* durante la regeneración de la aleta y el corazón mediante ISH y validado el resultado de los microarrays mediante PCR cuantitativa. Con esta última aproximación experimental, observamos que la expresión de *mdka* aumentaba desde 12 hpa, tanto en la regeneración del corazón como de la aleta, validando así el resultado del análisis de los microarrays (Figura 23B). Si bien es cierto que en el microarray veíamos una ligera disminución de la transcripción de *mdka* a las 12 hpa, con la PCR cuantitativa observamos que estos aumentaban mucho (en torno a 2).

Al analizar el patrón de expresión de *mdka* durante la regeneración de la aleta observamos que a 12 hpa se expresaba en la epidermis de la herida por encima de los radios esqueléticos y en el bolsillo interr radial (Figura 23C). Posteriormente, a 1dpa *mdka* se expresaba en la zona del blastema y seguía expresándose, aunque con menor intensidad, en el bolsillo interr radial. A 2dpa veíamos que su expresión se restringía a la zona del blastema por encima de los radios esqueléticos. El último punto que analizamos fue 3dpa y observamos

que la expresión se localizaba en el blastema más distal y la epidermis inmediatamente por encima (Figura 23C).

Durante la regeneración del corazón *mdka* se expresaba desde 1dpa hasta 14dpa (Figura 23D). A 1dpa, *mdka* aparecía por todo

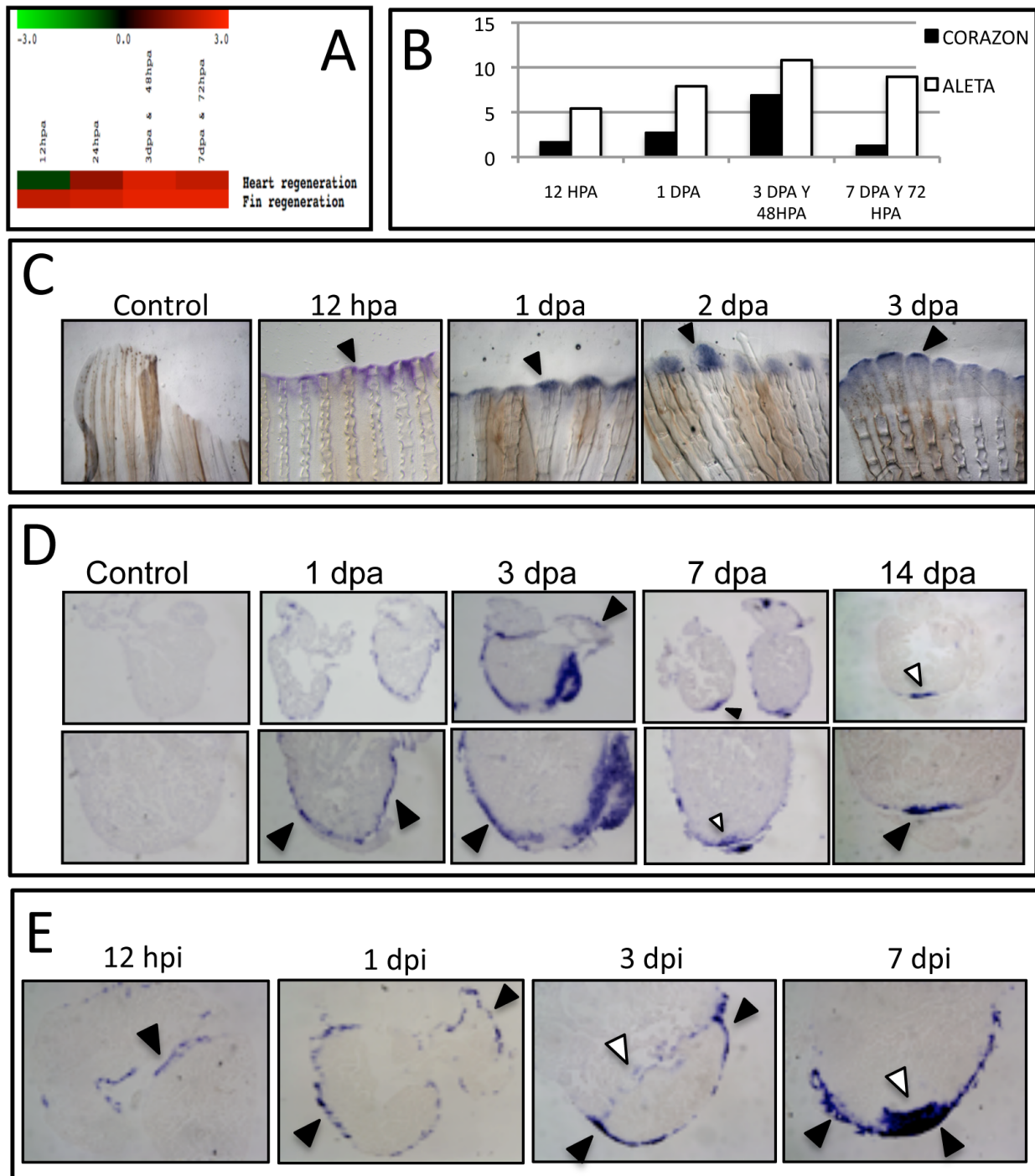


Figura 23. Midkine-a (*mdka*) se expresa durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Resultados de los microarrays. La transcripción de *mdka* aumenta durante la regeneración de la aleta y del corazón. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas los agrupamientos la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. **(B)** PCR cuantitativa de *mdka* durante la regeneración. La transcripción están aumentada en todos los tiempos analizados. **(C)** Patrón de expresión *mdka* durante la regeneración de la aleta a 12 hpa, 1, 2 y 3 dpa. Se expresa en la zona donde aparecerá el blastema a 12hpa y el blastema a partir de 24 hpa. **(D)** Patrón de expresión de *mdka* durante la regeneración del corazón en el modelo de amputación a 1, 3, 7 y 14 dpa. Se expresa por todo el epicardio a 1dpa y posteriormente se restringe su expresión a la zona amputada. **(E)** Patrón de expresión de *mdka* durante la regeneración cardíaca en el modelo de crioinfarto a 12 hpi, 1, 3 y 7 dpi.

Resultados

el epicardio. A 3dpa, el patrón de expresión se mantenía y se extendía al epicardio que se expande para recubrir la herida. A 7dpa comenzaba a restringirse de manera evidente la expresión de *mdka* en el epicardio de la zona más próxima a la herida, a la vez que el miocardio de la zona en regeneración comenzaba también a expresarlo. En el resto del epicardio, se podía observar expresión en zonas limitadas y distantes del plano de amputación pero desaparecía de forma clara de la mayoría de las células. Finalmente, a 14dpa la expresión de *mdka* estaba limitada al epicardio de la zona dañada así como al miocardio subyacente

(Figura 23D).

Hemos analizado también el patrón de expresión de *mdka* durante la regeneración del corazón en el modelo de crioinfarto y al igual que en los casos anteriores, *mdka* se expresaba durante la regeneración del tejido (Figura 23E). La expresión de *mdka* se observaba a partir de 12 hpi, en el epicardio de la aurícula y del ventrículo. Esta expresión era aún más evidente a 1 dpi. A 3 dpi, se restringía la expresión al epicardio que recubría el área infartada y a la zona sana más próxima. También se apreciaba su expresión en el endocardio existente entre el

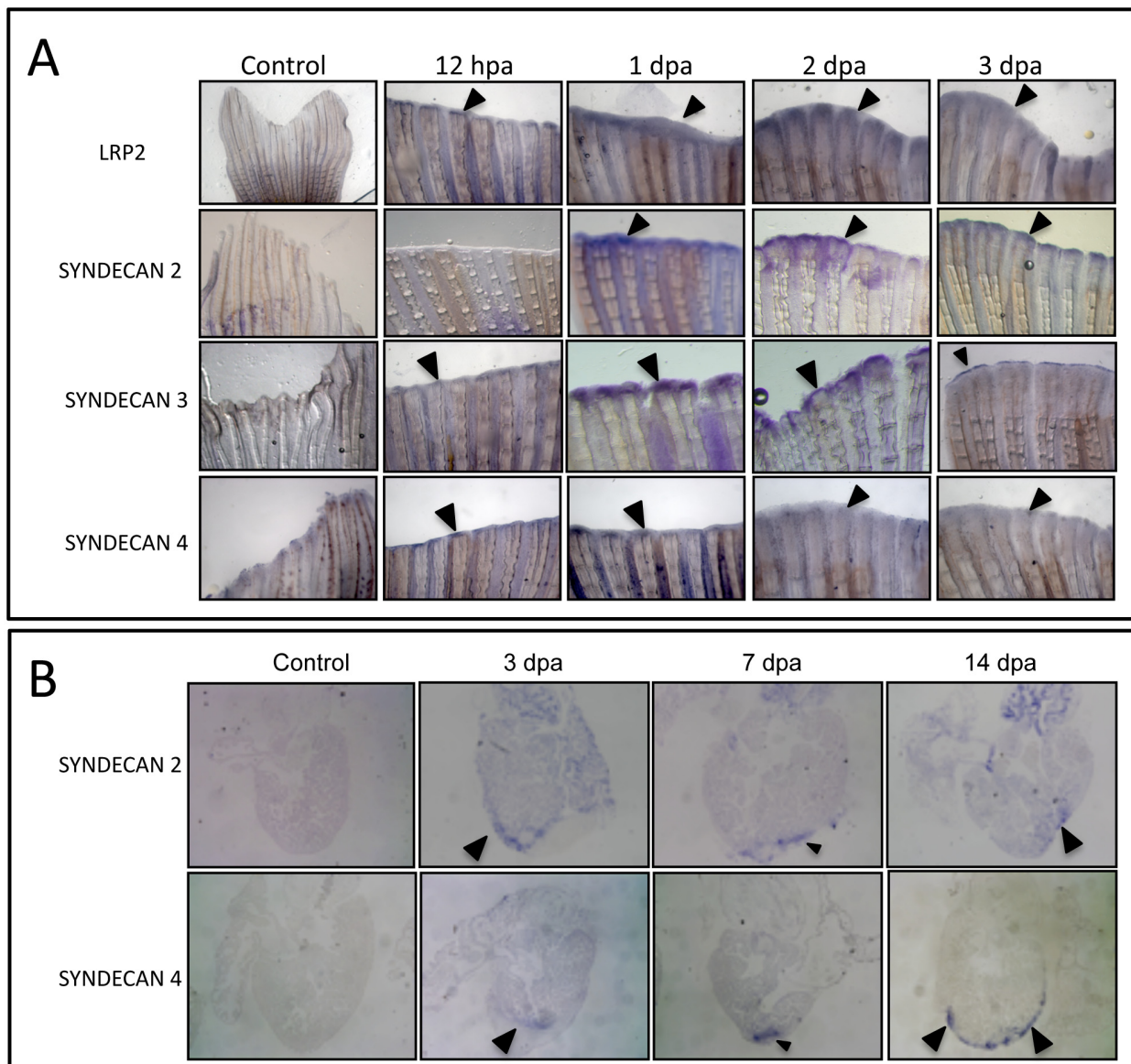


Figura 24. Distintos genes de los receptores de midkine-a se expresan durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Expresión de Lrp2, syndecan-2, syndecan-3 y syndecan-4 a 12 hpa, 1, 2 y 3 dpa durante la regeneración de la aleta. Todos ellos aumentan su expresión. **(B)** Expresión de syndecan-2 y syndecan-4 durante la regeneración del corazón.

límite de la zona dañada y la zona sana. A 7 dpi, desaparecía de esta zona pero se observaba sin embargo en el miocardio más externo de la zona lesionada (Figura 23E).

Decidimos comprobar que ocurría con los receptores de *mdka* durante la regeneración de la aleta y del corazón. Para ello caracterizamos mediante ISH el patrón de expresión de los receptores descritos para *mdka*. Entre la gran variedad de moléculas que actúan como receptores de *mdk* se encuentran LRP (Muramatsu et al., 2000) y los syndecans (Mitsiadis et al., 1995; Muramatsu et al., 2000; Nakanishi et al., 1997).

Durante la regeneración de la aleta la expresión de *LRP2* y *syndecan 2*, *3* y *4* aumentaba desde las 12 hpa hasta los 3 dpa y su patrón de expresión era muy parecido al que acabamos de describir para *mdka*. Todos ellos, a excepción de *syndecan2*, se expresaban a 12 hpa en la epidermis de la herida por encima de los radios esqueléticos (Figura 24A). Posteriormente, a 1 dpa se expresaban en el blastema y todos a excepción de *LRP2* también se expresaban en el bolsillo interradianal. A 2 dpa, se restringía la expresión a la parte más distal del blastema. Posteriormente a 3 dpa, se restringía aún más el dominio de expresión de los receptores para quedar confinado al blastema distal y casi desaparecer en el caso de *Syndecan4* y *LRP2* (Figura 24A). *Syndecan 2* y *3* eran los que mostraban un patrón de expresión más similar al de *mdka*.

Durante la regeneración del corazón, únicamente vimos que aumentaba la expresión de *syndecan 2* y *syndecan 4*. Ambos tenían un patrón de expresión muy similar y comenzaban a expresarse a 3 dpa (Figura 24B). Desde 3 dpa hasta 14 dpa que fue el último punto que analizamos, *Syndecan 2* y *Syndecan4* se expresaban en el endocardio y miocardio de la zona de la herida.

El patrón de expresión de *mdka* durante la regeneración del corazón nos recordaba la expresión de otros genes propios del desarrollo del epicardio, que se re-expresan durante la regeneración del corazón, como es el caso de

tbx18 (Lepilina et al., 2006). Hicimos ISH en secciones seriadas para ver si el patrón de expresión de *mdka* se superponía con el de genes marcadores del epicardio como *tbx18*, o bien con genes marcadores del miocardio como la *cadena ligera de la miosina cardiaca* (*cmlc2*). *cmlc2* se ha descrito como marcador del miocardio adulto y el miocardio en regeneración no lo expresa, de manera que se usa para diferenciar el miocardio en regeneración del miocardio intacto, o el ya ha regenerado (Lepilina et al., 2006). Para marcar el miocardio en regeneración utilizamos *hand2*, que es el gen de un factor de transcripción bHLH implicado en la regeneración del corazón, expresado en el miocardio en regeneración, solapando sólo parcialmente con *cmlc2* (Lepilina et al., 2006; Wills et al., 2008a). De esta manera vimos que *mdka* se expresaba a 7 dpa en el ápice del ventrículo en una zona donde no se expresa *cmlc2* y sí lo hacen *hand2* y *tbx18*. La expresión de *syndecan 2*, que tiene un dominio más limitado que la de *mdka*, era muy parecida y casi solapante con la de *hand2*. Ambos se expresaban justo por debajo o por fuera del límite de expresión de *cmlc2* (Figura 25A).

Posteriormente efectuamos ISH dobles y observamos que la expresión de *mdka* no solapaba con la de *cmlc2* en ninguno de los tiempos analizados (1, 3, 7 y 14 dpa) mientras que sí lo hacía con la de *tbx18* (Figura 25B). Este resultado nos hizo concluir que *mdka* se expresaba tanto en el epicardio como en el miocardio dañado, y no lo hacía en el miocardio maduro o intacto.

El último de los genes cuya expresión estudiamos fue *caveolin1*. Caveolina 1 (cav-1) es una proteína responsable de la formación y función de las caveolas y se localiza en la membrana plasmática y en el golgi (Chidlow and Sessa, 2010). Las caveolas son invaginaciones o vesículas de la membrana plasmática de forma circular, con un diámetro de 50-100nm, que participan y regulan multitud de funciones celulares (Chidlow and Sessa, 2010). Las caveolas son un tipo especializado de balsas lipídicas que se encuentran en diferentes tipos celulares y a distintas densidades, siendo más

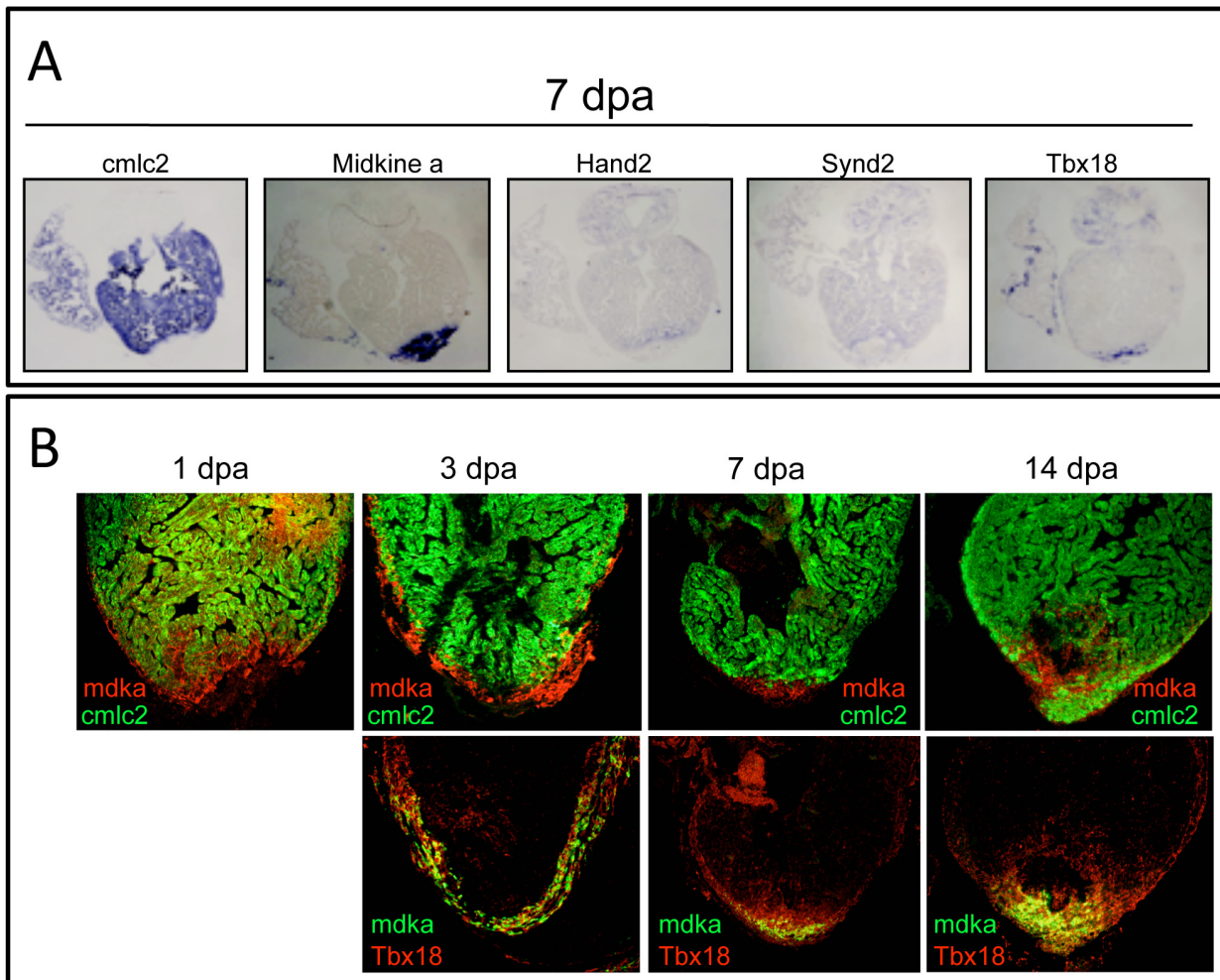


Figura 25. Mdka se expresa en epicardio y en el miocardio dañado. (A) Expresión de *cmlc2*, *mdka*, *hand2*, *synd2* y *tbx18* en secciones seriadas a 7 dpa. El dominio de expresión de *mdka* se superpone parcialmente con los de *hand2* (marcador de miocardio en regeneración, no maduro), *synd2* (receptor de midkine) y *tbx18* (marcador de epicardio) pero no con el de *cmlc2* (marcador de miocardio maduro y/o no dañado). (B) ISH dobles para *mdka* y *cmlc2* y *mdka*-*tbx18* a distintos tiempos durante la regeneración del corazón. El dominio de expresión de *mdka* se superpone con el de *tbx18* (epicardio) pero no con el de *cmlc2* (miocardio maduro/no dañado).

prominentes en células del endotelio vascular, fibroblastos, adipocitos y células endoteliales. Estas balsas lipídicas pueden funcionar como plataformas de señalización celular y regular la kinesis de vesículas de transporte, haciéndolas versátiles e integrándolas en la fisiología celular (Chidlow and Sessa, 2010). Cav-1 está presente en la mayoría de los tipos celulares del sistema cardiovascular y regula la producción endotelial de óxido nítrico (NO), la permeabilidad microvascular, la entrada de Ca^{2+} a la célula, la remodelación vascular y la angiogénesis (Chidlow and Sessa, 2010). Durante la reparación de heridas Cav-1 juega un importante papel en la migración de los fibroblastos al reciclar en caveolas los receptores de $\text{itg}\alpha 5$ (Bass et al., 2011).

Nuestros resultados con los microarrays indicaban que la transcripción de *cav-1* aumentaba durante la regeneración del corazón pero disminuía durante la regeneración de la aleta (Figura 26A). Quisimos validar mediante PCR cuantitativa los cambios en su transcripción. Curiosamente, la PCR cuantitativa contradecía los resultados de los arrays en la regeneración de la aleta, ya que mientras los arrays daban como resultado una disminución de los niveles de transcripción, los de la PCR indicaban un claro aumento. En el caso del corazón ambos resultados indicaban un claro aumento (Figura 26B). Para tratar de entender estas observaciones, decidimos analizar el patrón de expresión de *cav-1* durante la regeneración de la aleta y del corazón. Observamos que durante la

regeneración de la aleta se activaba la expresión de *cav-1* en la zona en regeneración. *Cav-1* se expresaba desde 12 hpa en la epidermis de la herida por encima de los radios esqueléticos. Este patrón de expresión se mantenía a 1 dpa y a 2dpa, *cav-1* se expresaba en el blastema de los radios. A 3 dpa, la expresión quedaba confinada al blastema distal. También vimos que *cav-1* se expresaba en aletas control que no habían sido amputadas. Esta expresión se localizaba de manera discontinua a lo largo de algunos

radios esqueléticos, y también en el extremo de la aleta (Figura 26C).

Durante la regeneración del corazón *cav-1* se expresaba a partir de 1 dpa por todo el epicardio. Esta expresión se mantenía hasta 7dpa, cuando se restringía al epicardio de la zona amputada (Figura 26D).

En base a estos resultados, decidimos examinar que ocurría con *PTRF-cavin*. PTRF-cavin es una proteína que forma parte de la

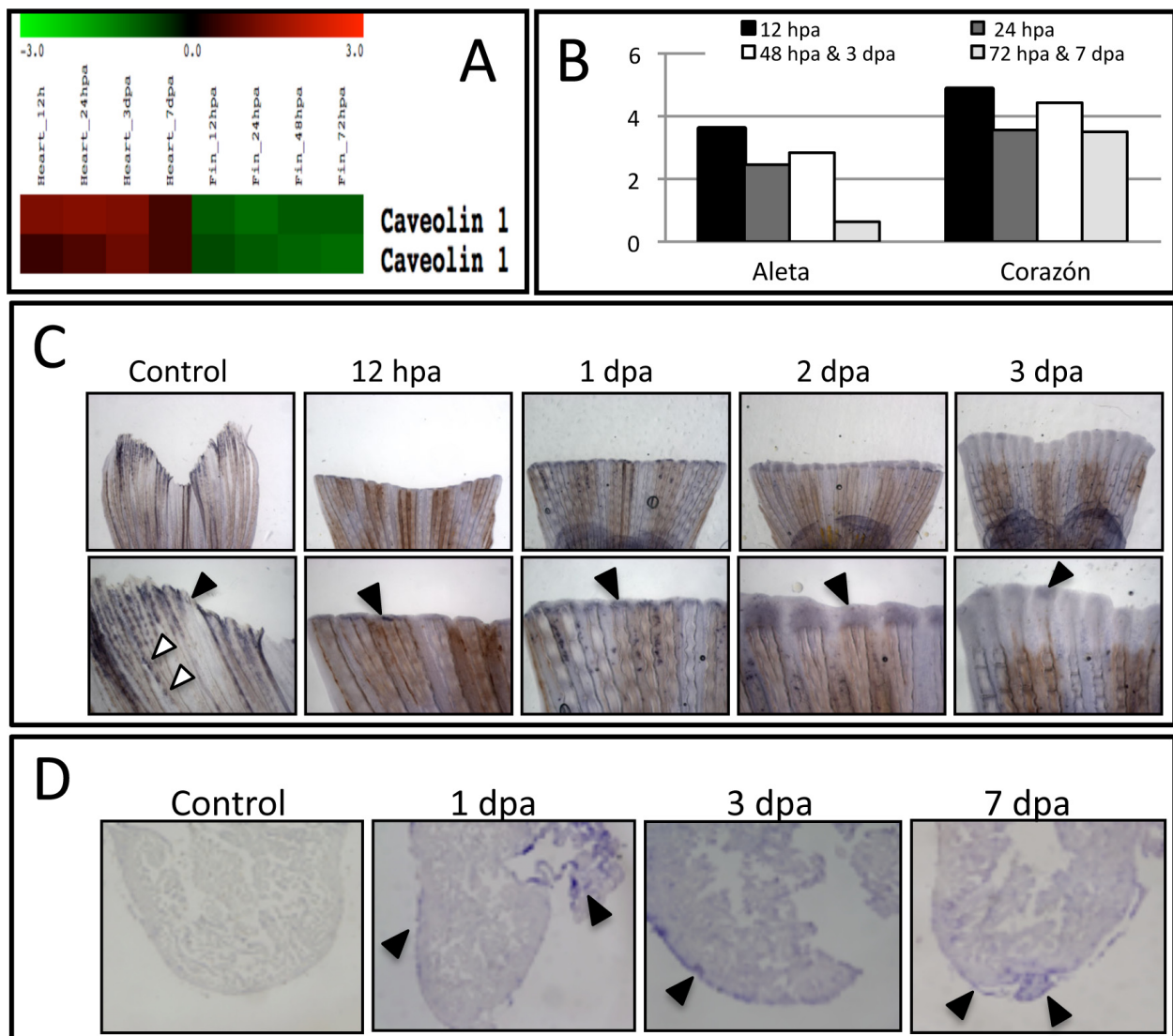


Figura 26. Caveolina 1 (*cav-1*) se expresa durante la regeneración de la aleta y del corazón. (A) Resultados del análisis de los microarrays. La transcripción de *cav-1* aumenta en la regeneración del corazón y disminuye durante la regeneración de la aleta. Los cambios están expresados en base logarítmica. En todas las agrupaciones la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. **(B)** PCR cuantitativa de *cav-1* durante la regeneración. Su transcripción aumenta en todos los tiempos analizados. Al contrario de los resultados que obtuvimos con el microarray, *cav1* aumenta su transcripción durante la regeneración de la aleta. **(C)** Patrón de expresión de *cav-1* durante la regeneración de la aleta a 12 hpa, 1, 2 y 3 dpa. Se expresa en la zona donde aparecerá el blastema a 12hpa y el blastema a partir de 24 hpa. **(D)** Patrón de expresión de *cav-1* durante la regeneración del corazón en el modelo de amputación a 1, 3 y 7.

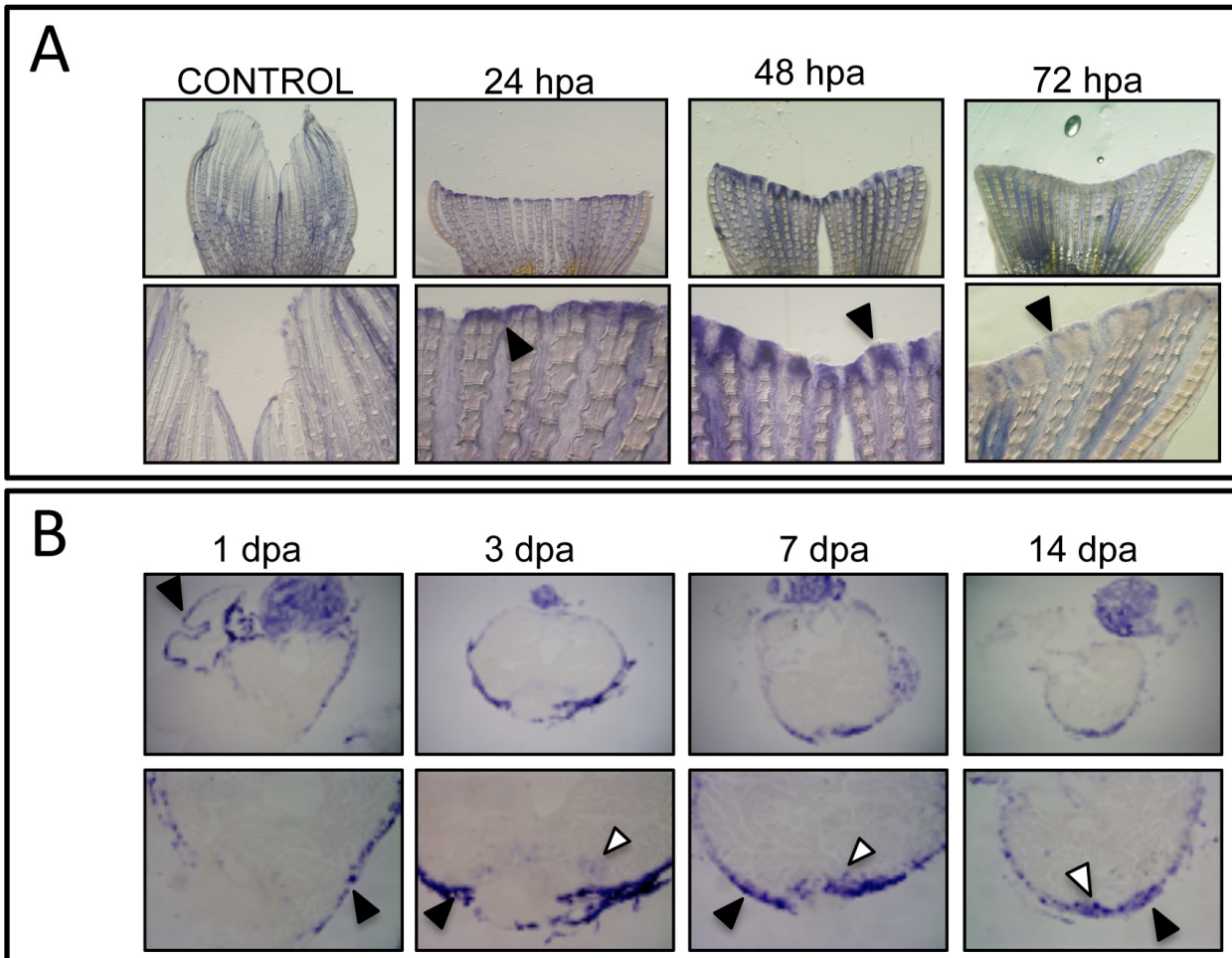


Figura 27. *Ptrf-cavin*, que codifica para una proteína implicada en la formación y funcionalidad de las caveolas, se expresa durante la regeneración del corazón y de la aleta. (A) Patrón de expresión de *ptrf-cavin* durante la regeneración de la aleta a 24, 48 y 72 hpa. El patrón de expresión es muy parecido al de *cav1*. **(B)** Patrón de expresión de *ptrf-cavin* durante la regeneración del corazón. A 1dpa se observa su expresión por todo el epicardio y a partir de 3 dpa se expresa también en el endocardio de la zona dañada.

cubierta de las caveolas y es necesaria para su formación y función (Hill et al., 2008). *Ptrf-cavin* no estaba presente en el microarray, así que comprobamos mediante ISH si sus niveles de expresión variaban en algunos de estos procesos. La expresión de *Ptrf-cavin* aumentaba a lo largo de la regeneración de la aleta desde las 24 hasta las 72 hpa (Figura 27A). Además este patrón de expresión era muy parecido al que presenta *cav-1*. En ambos casos, veíamos expresión en la zona del blastema tanto a 24 como a 48 hpa para después, a 72 hpa, quedar esta expresión restringida al blastema distal (Figura 27A).

La expresión de *PRTF-cavin* durante la regeneración del corazón era aún más evidente. A 1 dpa, se expresaba por todo el epicardio del

ventrículo y de la aurícula. También observamos expresión en células aisladas del miocardio y del endocardio más próximos al plano de amputación (Figura 27B). A 3dpa, se mantenía la expresión por todo el epicardio incluido aquel que había recubierto el miocardio expuesto. De la misma manera, en el endocardio y en el miocardio de la zona de la herida aumentaba el número de células que expresaban *PRTF-cavin*. A 7dpa aumentaba el número de células positivas dentro del miocardio y el endocardio de la herida, mientras que la expresión en el epicardio disminuía y pasaba a ser discontinua en vez de continua, como pasaba a 3dpa (Figura 27B). Este patrón de expresión se mantenía a 14 día haciéndose aún más fuerte o evidente la expresión en la zona de la herida.

Este resultado nos indicaba que durante ambos procesos se inducía la formación de caveolas y que estas van a jugar un papel importante durante el proceso. PTRF-cavin es una proteína estructural que forma junto con caveolina-1 las caveolas y que participa en la funcionalidad de estas (Hill et al., 2008).

4. VALIDACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN: PES

Hemos validado también algunos de los genes que identificamos como específicos de la regeneración del corazón y no de la aleta. Uno de estos genes fue *pescadillo* (*pes*). *Pescadillo* se identificó originariamente en el pez cebra

en una búsqueda de mutantes por mutagénesis insercional (Allende et al., 1996). Los peces mutantes para *pescadillo* mueren a 6 dpf y tienen ojos y cerebros reducidos así como defectos en el esqueleto visceral, que deriva en última instancia de células de la cresta neural (Allende et al., 1996). Los ratones deficientes para *pescadillo* mueren antes de la implantación y se ha demostrado que es esencial para el ensamblaje nucleolar, la biogénesis de los ribosomas y la proliferación celular (Kinoshita et al., 2001; Lerch-Gaggl et al., 2002). Además, *pescadillo* está implicado en inestabilidad cromosómica (Killian et al., 2004), en la transformación (Maiorana et al., 2004), en el cáncer (Kinoshita et al., 2001; Li et al., 2009), en la diferenciación y en la migración celular (Gessert et al., 2007).

La transcripción de *pescadillo* aumentaba en el microarray durante la regeneración

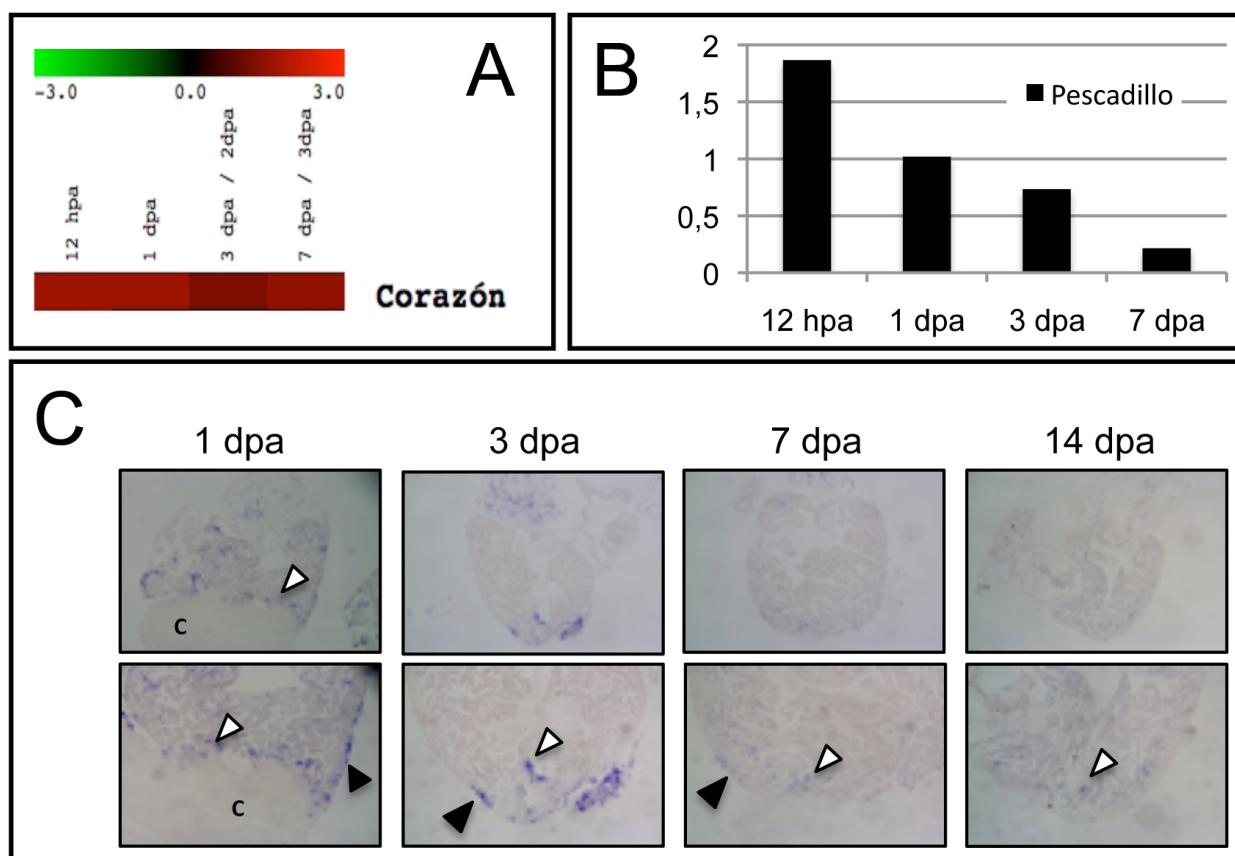


Figura 28. Pescadillo se expresa durante la regeneración del corazón. (A) Resultados del microarray representados en un diagrama de colores y de base logarítmica. En todas las agrupaciones la escala colorimétrica empleada es la misma que en la Figura 12. (B) Validación mediante PCR cuantitativa del aumento en la transcripción de *pescadillo* durante la regeneración del corazón. Aumenta mucho a 12 hpa para ir bajando paulatinamente a lo largo del tiempo. (C) Patrón de expresión de *pescadillo* durante la regeneración del corazón a 1, 3, 7 y 14 dpa (c=coágulo sanguíneo).

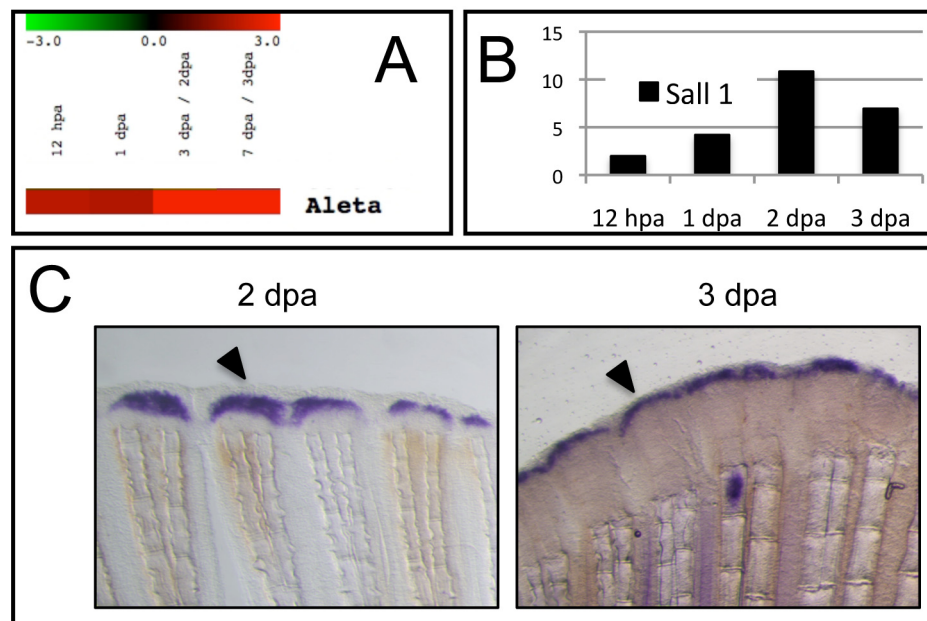


Figura 29. Sall1 se expresa durante la regeneración de la aleta. (A) Resultados del microarray representados en un diagrama de colores donde el rojo significa aumento y el verde disminución. (B) Validación mediante PCR cuantitativa del aumento en los niveles de transcripción de *sall1* durante la regeneración de la aleta. (C) Patrón de expresión de *sall1* durante la regeneración de la aleta a 1, 2 y 3 dpa.

del corazón, en todos los puntos analizados. Estudiamos por PCR cuantitativa el perfil de expresión de *pescadillo* y obtuvimos de nuevo un aumento en su transcripción. Al analizar mediante ISH su patrón de expresión vimos que se expresaba desde 1 dpa hasta 14dpa. A 1dpa, se expresaba en células del epicardio cercanas a la zona amputada y en células aisladas del endocardio y miocardio próximas al plano de amputación (Figura 28). A 3 dpa, lo hacía únicamente en la zona de la herida, tanto en el epicardio que recubría la zona amputada como en zonas del miocardio, endocardio e incluso en el coágulo sanguíneo. A 7dpa, disminuía su expresión y solo encontrábamos algunas áreas dispersas de expresión dentro de la zona amputada en regeneración. A 14 dpa, disminuía aún más sus niveles de expresión se mantenía en algunas células dentro de la misma zona (Figura 28).

5. VALIDACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA: *SALL1*, *SOX11A* Y *SOX11B*.

Analizamos independientemente la regeneración de la aleta y fuimos capaces de identificar genes cuya expresión cambiaba en todos los puntos y que no habíamos detectado en el análisis conjunto de la regeneración del corazón y de la aleta. Entre los genes que identificamos que más nos llamaron la atención estaban *sall1*, *sox11a* y *sox11b*. Quisimos validar los resultados del microarray mediante PCR cuantitativa y/o ISH.

sall1 es uno de los cuatro miembros pertenecientes a la familia *sal* o *spalt* que encontramos en humanos, ratón y pez cebra y que fueron originariamente identificados en *Drosophila* y codifica para un factor de transcripción con un dominio de dedos de zinc (de Celis and Barrio, 2009). Sall1 tiene un papel muy importante durante el desarrollo y está implicado en morfogénesis, especificación de destino celular y organogénesis tanto en invertebrados como en vertebrados (de Celis and Barrio, 2009). Además se ha visto en ratones que Sall1 está implicado en la morfogénesis de la extremidad, modulando la actividad de Hox (Kawakami et al., 2009). Su mutación tanto en humanos como en ratones causa el síndrome de Townes-Brocks que entre otros efectos,

produce alteraciones en las extremidades (de Celis and Barrio, 2009). Recientemente se ha visto que juega un papel muy importante en células madre embrionarias de ratón (mESC) regulando la activación y represión de genes en asociación con Nanog, cuya expresión regulada también por Sall1, y reprime la diferenciación a ectodermo y mesodermo (Karantzali et al.). Además se implicado en angiogénesis a través de la unión al promotor de VEGF-a para inducir su expresión (Yamamoto et al.).

Los resultados de la PCR cuantitativa nos corroboraron lo que ya habíamos visto anteriormente con los microarrays (Figura 29A). La expresión de *sall1* se inducía durante el proceso regenerativo. La transcripción de *sall1* aumentaba a las 12hpa por encima de 2 para alcanzar un máximo a los 2dpa (Figura 29B). Al analizar su patrón de expresión mediante ISH vimos que a 2 dpa se expresaba muy claramente en la parte más distal del blastema por encima de los radios esqueléticos y por debajo de la

epidermis. A 3dpa la expresión se restringía al blastema más distal (Figura 29C).

Otros genes que identificamos en el análisis de los cambios en el transcriptoma durante la regeneración de la aleta fueron el *Sex determining region (SR)-Box containing gene 11a (sox11a)* y *SRY-Box containing gene 11b (sox11b)*. Sox11a y Sox11b pertenecen a la familia de factores de transcripción SRY-Box (Sox) que se caracterizan por tener un dominio de unión a ADN de unos 70 aminoácidos conocido como caja de grupo de alta movilidad (High Mobility Group box, HMG) (Rimini et al., 1999). Muchos de los miembros de esta familia están implicados en la especificación y el mantenimiento de la identidad de progenitores neurales en el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico (Pevny and Placzek, 2005; Wegner and Stolt, 2005). Sox11 en ratón regula la supervivencia y el crecimiento axonal de las neuronas sensoriales embrionarias (Jankowski et al., 2006; Lin et al.)

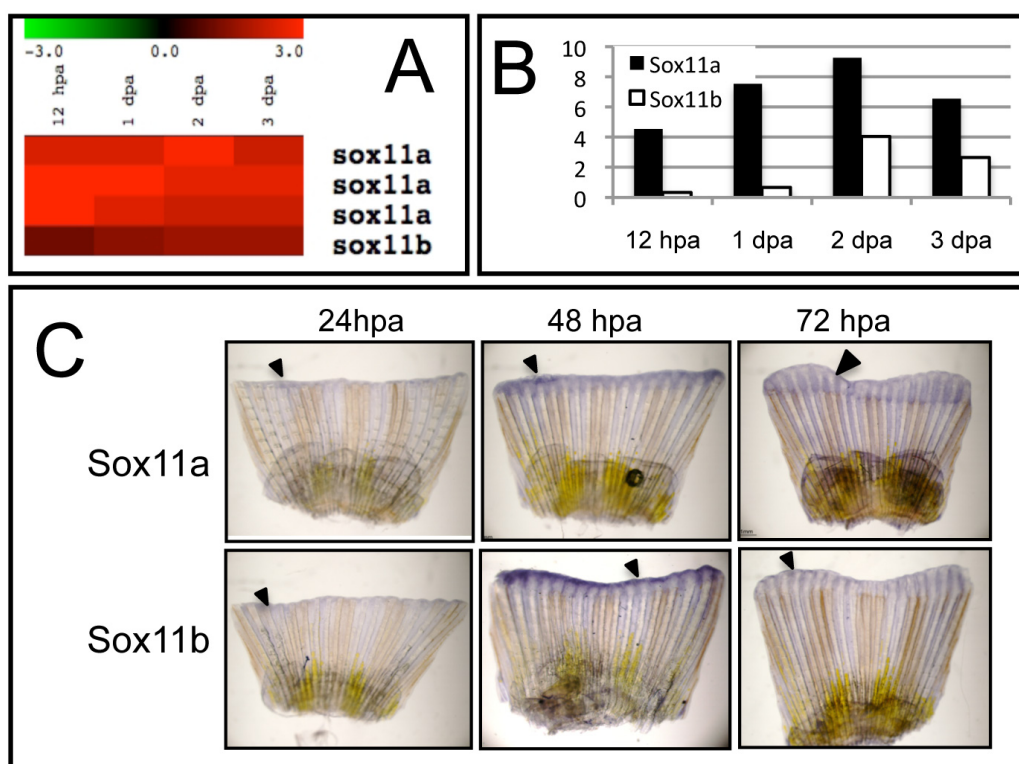


Figura 30. Sox11a y sox11b se expresan durante la regeneración de la aleta. (A) Resultados del microarray representados en un diagrama de colores codificados como en la Figura 12. El microarray tiene tres sondas para *sox11a* y para todas ellas el resultado es el mismo. (B) Validación mediante PCR cuantitativa del aumento en la transcripción de *sox11a* y *sox11b* durante la regeneración de la aleta. El aumento de *sox11a* parece mucho mayor que el de *sox11b*. (C) Patrón de expresión de *sox11a* y *sox11b* durante la regeneración de la aleta a 24, 48 y 72 hpa.

y la supervivencia de células neurales durante el desarrollo de la espina cordal (Thein et al.). Además, en ratones adultos *Sox11* modula la regeneración de nervios periféricos (Jankowski et al., 2009) y es uno de los genes cuya expresión aumenta tras una herida en la espina cordal cuando se hace un transplante de células glias radiales, lo que mejora la recuperación del trauma (Chang et al., 2009). En pez cebra existen dos genes *sox11* (*sox11a* y *sox11b*) (Rimini et al., 1999) que provienen de una duplicación del *sox11* ancestral y entre los dos son responsables de las mismas funciones que el ortólogo de mamíferos (de Martino et al., 2000). En un trabajo con microarrays muy parecido al nuestro, se observó que la expresión de ambos genes aumentaba durante la regeneración de la aleta caudal. Este resultado se validó mediante PCR, observándose el aumento de *sox11b* (Schebesta et al., 2006). También se ha implicado a *Sox11b* en la regeneración de la espina dorsal en el pez cebra, donde promueve determinación neural de células madre endógenas y la neurogénesis regenerativa (Guo et al.), y en la regeneración de la retina (Morris et al.)

Al analizar por PCR cuantitativa el perfil de transcripción de ambos durante la regeneración de la aleta, comprobamos que aumentaba frente al control (Figura 30B). La inducción de *sox11a* parecía ser más fuerte que la *sox11b* y los dos seguían la misma tendencia: incrementaban su expresión hasta 2dpa, cuando alcanzaban su máximo (alrededor de 9 *sox11a* y alrededor de 4 *sox11b*) y bajaban a 3dpa (Figura 30B).

También analizamos sus patrones de expresión durante la regeneración y vimos que eran muy parecidos en todos los tiempos analizados (Figura 19C). A 1dpa se expresaban encima de los radios esqueléticos en la zona que va a dar lugar al blastema. La expresión de *sox11a* era más fuerte que la de *sox11b* (Figura 30C). Esto cambiaba sin embargo a 2 dpa donde pudimos ver que la expresión de *sox11b* era mayor que la de *sox11a*. Ambos se expresaban en la zona más distal del blastema, en la epidermis justo por encima del blastema distal y en la zona interradyal desde el extremo de la zona

regenerada hasta el plano de amputación (Figura 30C). Este patrón de expresión se mantenía a 3 dpa aunque la intensidad de la señal era más floja. En la zona interradyal la expresión no llegaba hasta el plano de amputación y se quedaba hasta alrededor de la mitad de la longitud total de la distancia regenerada desde el extremo al plano de amputación (Figura 30C).

6. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN EN LA REGENERACIÓN DE LA ALETA DE GENES SELECCIONADOS: *RALDH2*, *MDKA*, *SYNDECAN-2*, *CAV-1* Y *PTRF-CAVIN*.

Para comprobar si los genes que habíamos identificado y validado estaban funcionalmente implicados en el proceso regenerativo, decidimos llevar a cabo experimentos de pérdida de función durante la regeneración de la aleta mediante la inyección de morfolidos (MO). La inyección y electroporación de MO es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para demostrar la implicación funcional de genes en la regeneración de la aleta caudal en el pez cebra (Bouzafeur et al., 2009; Chablais and Jazwinska, 2010; Hoptak-Solga et al., 2008; Jazwinska et al., 2007; Kizil et al., 2009; Rojas-Munoz et al., 2009; Thatcher et al., 2008; Thummel et al., 2006; Thummel et al., 2007; Yin et al., 2008). Tras amputar la aleta se deja que regenere 1 ó 2 días y posteriormente se inyecta el MO en la mitad dorsal o ventral de la aleta en regeneración, de forma que la otra mitad queda como control interno. Posteriormente, se electropora la aleta entera, se deja a los peces regenerar y se vuelve a mirar 2 días después para ver si existen diferencias entre la mitad inyectada con el morfolino y la mitad control.

Decidimos comprobar si en nuestra manos la técnica funcionaba inyectando un morfolino contra *RBPjk*, factor de transcripción efector de la vía de Notch. La implicación de notch en la regeneración de la aleta ya había sido demostrada y disponíamos del morfolino en el

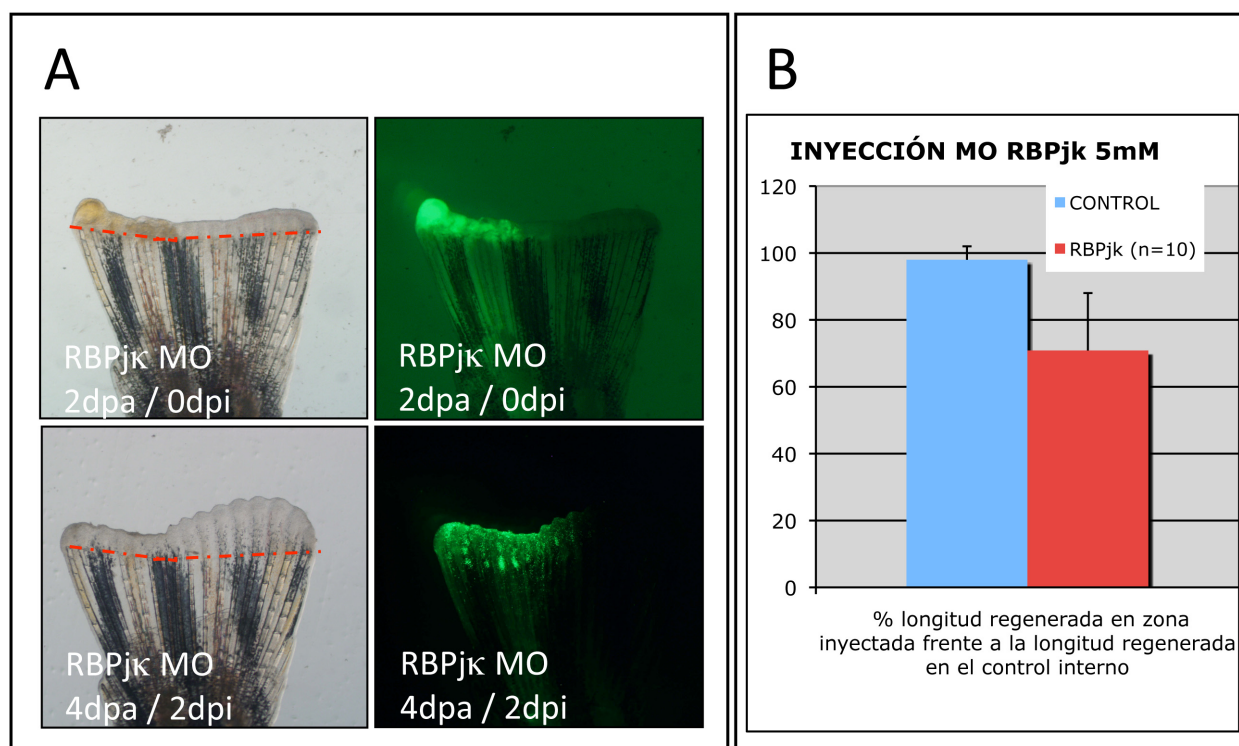


Figura 31. La señalización a través de la vía de Notch es necesaria para la regeneración de la aleta.

(A) La inyección/electroporación de un MO específico de RBPjkK inhibe la regeneración de la aleta. El plano de amputación está marcado por una línea discontinua roja. (B) Cuantificación de la distancia regenerada en la mitad inyectada /electroporada con un MO control o con el MO de RBPJK con respecto sus controles internos (mitades no inyectadas).

laboratorio. Este morfolino se había usado con éxito en experimentos de desarrollo en el pez cebra y sabíamos que inhibía la traducción de la proteína (Sieger et al., 2003; Siekmann and Lawson, 2007). Al inyectar y electroporar el MO observamos que se inhibía la regeneración (Figura 31A). La mitad de la aleta que había sido inyectada con el MO de *RBPjk* regeneraba un 70% con respecto al control interno, que era la mitad sin inyectar. La inyección de un MO control por el contrario no tenía ningún efecto (Figura 31B).

6.1 Raldh2.

A continuación nos centramos en los genes que habíamos identificado y validado. La inyección de un MO contra *raldh2* también inhibía la regeneración de la mitad dorsal donde se había inyectado (Figura 32A). Cuantificamos esta inhibición comparándola con la que produce la inyección/electroporación de un MO control. No había diferencias entre la mitad inyectada con el MO control respecto a su control interno,

mientras que las aletas inyectadas con el MO para *raldh2* regeneraban sólo un 68% respecto al control interno (Figura 32B). También hemos observado que la inhibición farmacológica de la vía también afecta a la regeneración de la aleta. Para ello, hemos amputado la aleta a varios peces y los hemos puesto a regenerar durante distintos periodos de tiempo en agua que contenía DEAB o Citral (ambos inhibidores del ácido retinoico) o en DMSO (control). En los peces que estaban en los tanques con DMSO, la regeneración no se afectaba, mientras que en los peces que estaban en los tanques con DEAB o Citral, sí (Figura 32C). Además, hemos observado que la inhibición temprana y potente de la vía mediante DEAB a 50uM afectaba a la formación de la epidermis de la herida y del blastema (Figura 32C). De manera similar, usando Citral a concentraciones más bajas también se afectaba la regeneración. A 7dpa, la epidermis de la herida y el blastema se habían formado, pero el crecimiento regenerativo estaba muy afectado (Figura 32C).

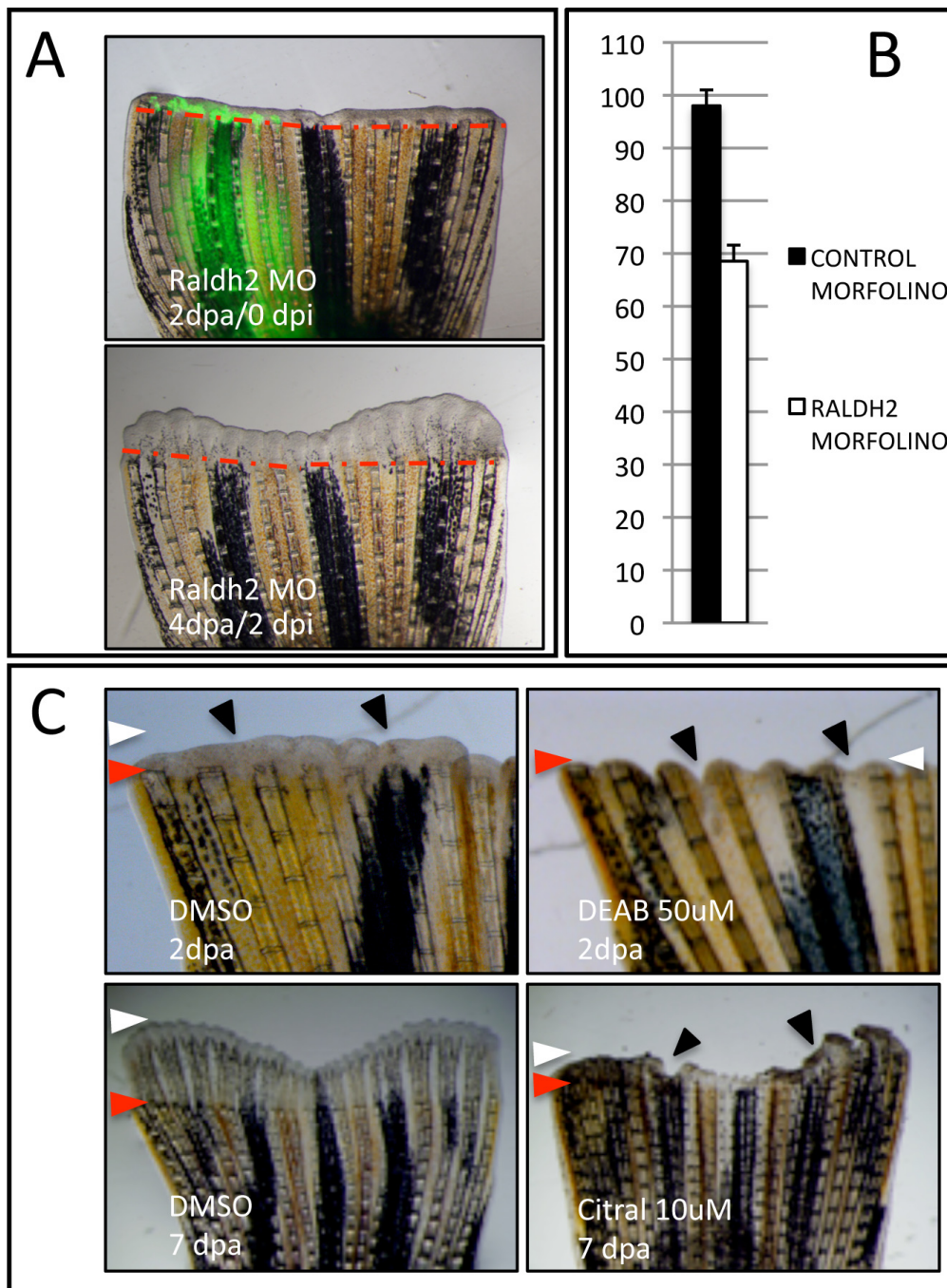


Figura 32. La señalización por ácido retinoico (RA) se requiere durante la regeneración de la aleta para la formación del blastema y el crecimiento regenerativo. (A) La inyección/electroporación de un morfolino (MO) específico de *raldh2* inhibe la regeneración de la aleta. El plano de amputación está marcado por una línea discontinua roja. (B) Cuantificación de la distancia regenerada en la mitad inyectada /electroporada con un MO control y con el MO de *raldh2* con respecto sus controles internos (mitades no inyectadas). (C) La inhibición farmacológica de la señalización de RA mediante diversos inhibidores específicos afecta a la formación del blastema a 2dpa (flechas negras) y al crecimiento regenerativo (7dpa) (flechas negras). El plano de amputación está señalado por una flecha roja. La distancia máxima regenerada está marcada por una flecha blanca.

6.2 *Mdka* y *syndecan-2*.

Hemos validado también la implicación funcional de *mdka*, identificado en nuestro microarray, y de uno de sus posibles receptores, *syndecan2*. La inyección del MO contra el

transcrito de *mdka* resultó en la inhibición del proceso (Figura 33A). Las aletas que fueron inyectadas con el MO para *mdka* regeneraban solo el 45% del área al compararlas con el control interno, mientras que la inyección de un MO control no tenía ningún efecto sobre

la regeneración de la aleta (Figura 33B). La inyección de un MO dirigido contra el mRNA de *syndecan2* también interfería la regeneración de la aleta (Figura 33A). La cuantificación de estos resultados demostró que la mitad inyectada/

electroporada con el MO sólo regeneraba en torno al 45% del área al compararla con el control interno (Figura 33B). Además, observamos que esta menor tasa de regeneración en la mitad inyectada con el MO iba acompañada de una

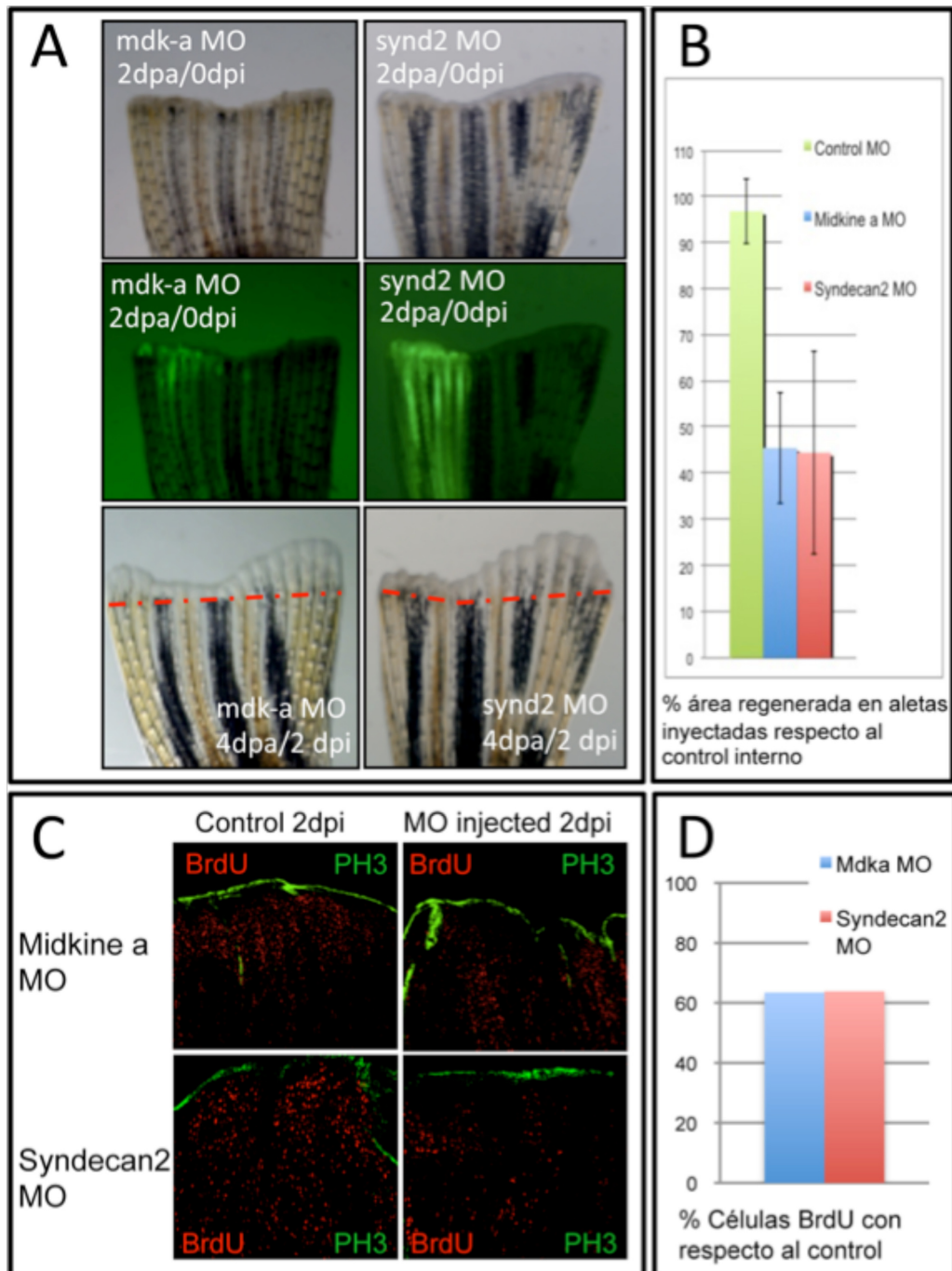


Figura 33. Midkine-a y syndecan-2 se requieren durante la regeneración de la aleta y su inhibición afecta a la proliferación. (A) La inyección/electroporación de un morfolino específico de *mdka* o de *syndecan2* inhibe la regeneración de la aleta. El plano de amputación está marcado por una línea discontinua roja. (B) Cuantificación del área regenerada en la mitad inyectada/electroporada con un MO control, con un MO de *mdka* y con un MO de *syndecan-2* con respecto sus controles internos (área regenerada en las mitades no inyectadas). (C) Incorporación de bromo desoxi-uridina (BrdU) dos días después de ser inyectadas/electroporadas con el MO de *mdka* o el MO de *syndecan-2*. (D) Cuantificación del número de células que han incorporado BrdU en las mitades inyectadas con el MO respecto al control interno.

Resultados

disminución en la incorporación de BrdU, tanto en las aletas inyectadas con el MO contra *mdka* como en aquellas inyectadas con el de *syndecan2* (Figura 33C). Al cuantificar el número de células que incorpora BrdU en las mitades inyectadas con el morfolino observamos que en ambos

casos representaban un 40% menos que en las mitades control (Figura 33D).

6.3 Caveolina-1 y PTRF-cavin

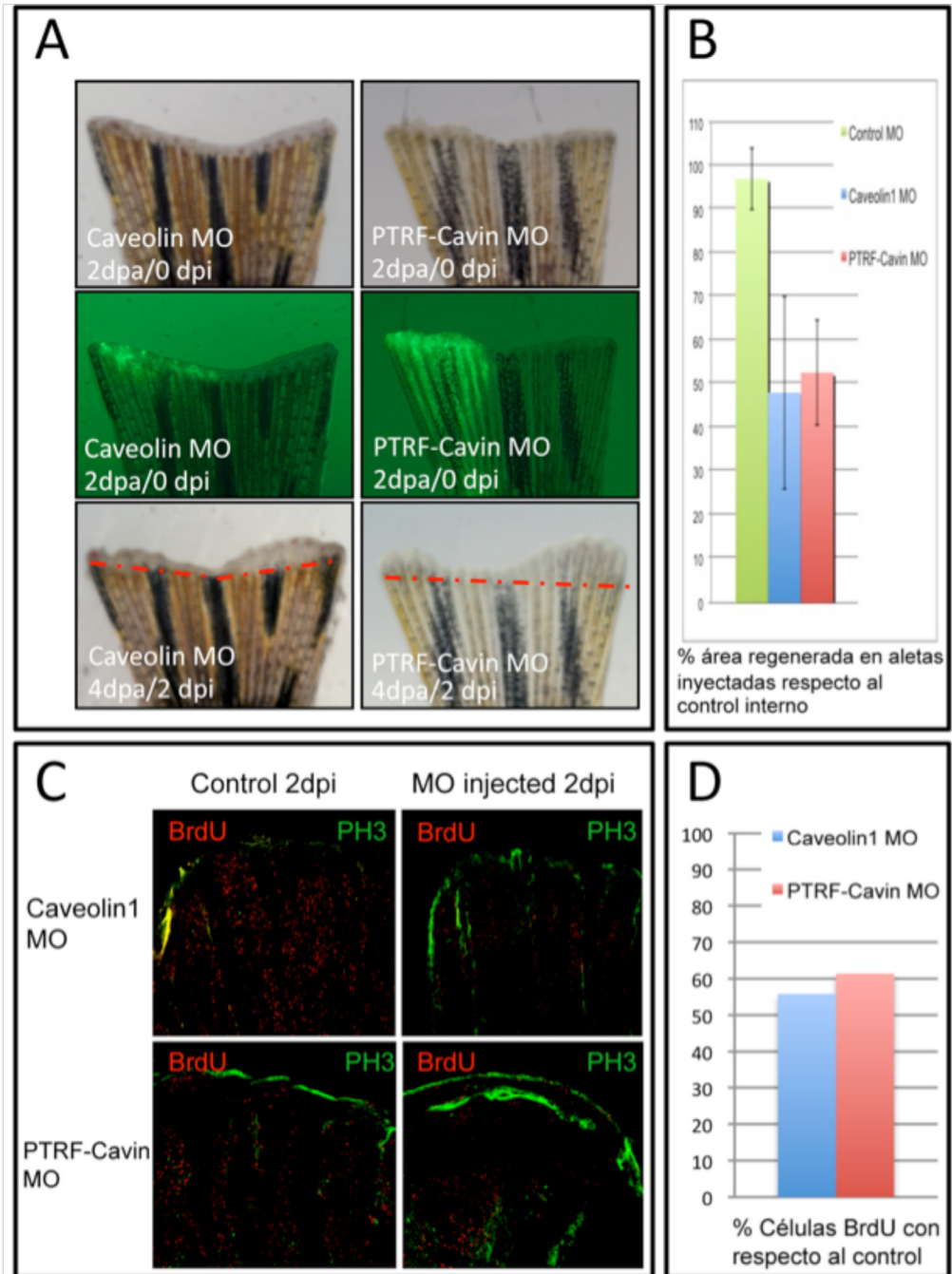


Figura 34. Caveolina-1 y PTRF-cavin se requieren para la regeneración de la aleta y su falta de función provoca un descenso en la proliferación. (A) La inyección/electroporación de un morfolino específico de *cav-1* o de PTRF-cavin inhibe la regeneración de la aleta. El plano de amputación está marcado por una línea discontinua roja. (B) Cuantificación del área regenerada en la mitad inyectada/electroporada con un MO control, el MO de *cav-1* y con el de PTRF-cavin con respecto sus controles internos (área regenerada en las mitades no inyectadas). (C) Incorporación de bromo deoxiuridina (BrdU) dos días después de ser inyectadas/electroporadas con el MO de *cav-1* o PTRF-cavin. (D) Cuantificación del número de células que han incorporado BrdU en las mitades inyectadas con el MO respecto al control interno.

Otro dos genes para los que hemos validado su implicación funcional mediante la inyección/electroporación de MO han sido *cav-1* y *PTRF-cavin*. La inyección de un MO contra *cav-1* a 2dpa afectaba a la regeneración (Figura 34A). Las mitades inyectadas con *cav-1* regeneraban menos del 50% cuando se las comparaba con las mitades control (Figura 34B). Lo mismo ocurrió cuando inyectamos un MO específico para *PTRF-cavin*. Se producía un fallo que afectaba de manera visible a la mitad inyectada (Figura 34A). Cuantificamos esta diferencia y vimos que las mitades inyectadas con el MO regeneraban solo alrededor del 51% del área que era capaz de regenerar la mitad sin inyectar (Figura 34B). Además hemos visto que esta reducción en el área regenerada va acompañada de un descenso en la tasa de proliferación, marcada como la incorporación de BrdU (Figura 34C). La cantidad de células positivas para BrdU en las mitades inyectadas con el MO de *cav-1* era un 45% menor que en el control. En el caso de la inyección del MO de *PTRF-cavina* el descenso en la cantidad de células positivas era casi del 40% (Figura 34D).

7. GENERACIÓN DE PECES TRANSGÉNICOS DE PÉRDIDA O GANANCIA DE FUNCIÓN PARA *MDKA* Y *CAV-1*. ANÁLISIS DEL FENOTIPO RESULTANTE DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y EL CORAZÓN.

Decidimos centrarnos en el papel que desempeñan *mdka* y *cav-1* durante los procesos de regeneración de la aleta y del corazón ya que habíamos visto que ambos eran necesarios para la regeneración de la aleta y todo hacía suponer que lo serían también en la del corazón. Además se había observado con anterioridad que ambos tienen un papel durante la reparación del daño tras infligir un insulto al corazón (Horiba et al., 2006; Patel et al., 2007). Para poder estudiar su implicación funcional

en estos procesos decidimos generar líneas transgénicas que nos permitieran manipularlos experimentalmente. Para esto, generamos diferentes líneas transgénicas que expresaban una versión dominante negativa de nuestro gen de interés seguida de un gen reportero, bajo el control de un promotor inducible. El promotor que hemos usado ha sido el de la *proteína de choque térmico de 70 kDa (Hsp70)*. Como gen reportero hemos utilizado la versión mejorada de la proteína verde fluorescente (*enhanced green fluorescent proteína*, EGFP). Hemos clonado *EGFP* en posición-3' de nuestro gen de interés separada por un elemento P2A. Este elemento P2A, deriva de una secuencia vírica de unos 18-21 aminoácidos (aa) que después de la traducción es reconocida por la maquinaria intracelular, se procesa y da lugar a dos polipéptidos (de Felipe et al., 2006). La secuencia P2A se ha utilizado con éxito para la generación de transgénicos en el pez cebra (Provost et al., 2007; Szymczak et al., 2004). La ventaja de este sistema frente a otros como el IRES, es que aquí la estequiometría se mantiene 1:1 y no interfiere en la función de la proteína. Además, no hay problemas derivados de una diferencia en las tasas de expresión de los dos transgenes como puede ocurrir al utilizar el IRES (Mizuguchi et al., 2000), ni problemas de modificar la función como puede ocurrir al generar una proteína de fusión (de Felipe et al., 2006).

7.1 Generación de las líneas transgénicas *mdka* y *cav-1* y su fenotipo durante el desarrollo embrionario.

En el caso de *mdka*, decidimos generar distintas líneas transgénicas a partir de distintas versiones dominantes negativas de *Mdka* (Chen et al., 2007; Winkler and Moon, 2001) o de su hipotético receptor Syndecan-2 (Chen et al., 2004) que ya habían sido descritos anteriormente (Chen et al., 2004; Chen et al., 2007; Winkler and Moon, 2001), así como la versión wild type del gen. De esta manera podríamos hacer experimentos de pérdida de función mediante la inducción del transgen dominante negativo,

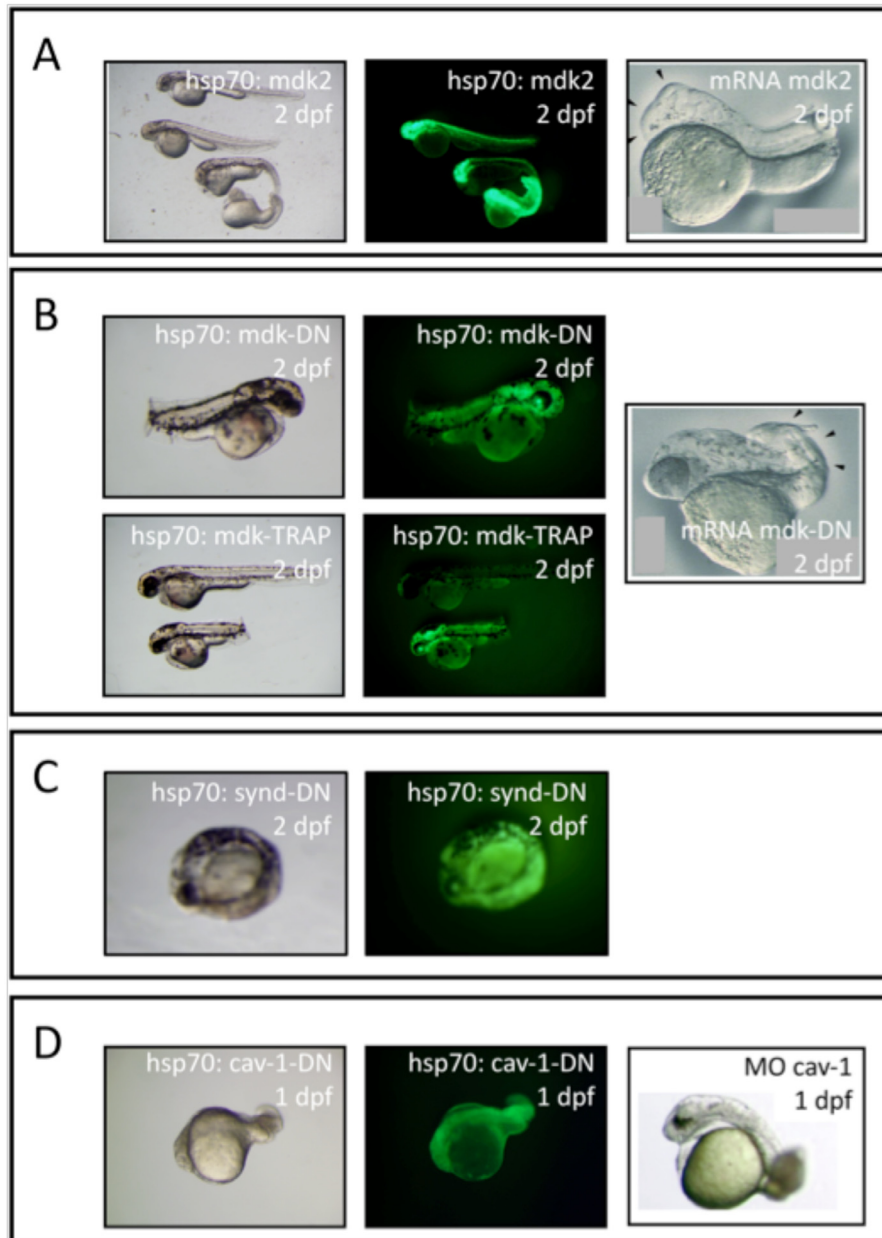


Figura 35. La inducción controlada de la versión wild type (*hsp70: mdk*) o dominantes negativas (*hsp70: mdk-DN*; *hsp70: mdk-TRAP*; *hsp70: synd2-DN*; *hsp70: cav-1-DN*) en las distintas líneas transgénicas afecta al desarrollo embrionario. (A) La sobreexpresión de midkine en el transgénico *hsp70: mdk2* da lugar a un fenotipo de... a 2 dpf muy similar al descrito para la inyección del ARN mensajero (panel de la derecha extraído y modificado de (Winkler and Moon, 2001)). (B) La inducción del transgén en las líneas de pérdida de función *hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP* da lugar a un fenotipo a 48 hpf de... muy parecido al de la inyección de ARNm de la versión dominante negativa de midkine (Winkler and Moon, 2001). (C) La inducción de la expresión del dominante negativo de synd-2 en el transgénico *hsp70: synd2-DN* afecta al desarrollo embrionario. (D) La expresión del dominante negativo en la línea transgénica *hsp70: cav-1-DN* tras choque térmico da lugar a un fenotipo a 24 hpf similar al de la inyección de un MO específico para *cav-1* (Fang et al., 2006).

o de ganancia de función, al sobreexpresar la versión wild type del gen.

En el caso de *cav-1* hemos generado 2 líneas distintas, una para la pérdida de función mediante la sobreexpresión de una versión dominante negativa de *cav-1* de rata (Gonzalez

et al., 2007), y otra para la ganancia de función mediante la sobreexpresión de la versión wild type del gen *cav-1* de rata.

Inyectamos las construcciones en huevos fertilizados en el estadio de una célula, y dejamos crecer y desarrollarse a los

embriones. Esta generación (F0) la cruzamos con peces silvestres de la línea AB y buscamos en la descendencia (F1) aquellos peces que expresaran la *EGFP* para poder seleccionar a sus parentales, y utilizarlos como fundadores. Para comprobar que el transgén era capaz de interferir en la función del gen wild type, sometimos a choque térmico a los embriones de la F1 y analizamos el fenotipo que mostraban a las 24 o 48 horas después de la fertilización. Observamos que el fenotipo que mostraban las líneas dominantes negativas y de sobreexpresión de *mdka* eran muy similares a los descritos cuando se le inyecta el mRNA de *mdka*, para hacer sobreexpresión, o su versión dominante negativa, para hacer pérdida de función (Figura 35A y B). La sobreexpresión de la forma wild type del gen da lugar a la caudalización del embrión, con una típica pérdida o disminución de la región cefálica (Winkler and Moon, 2001). Este resultado fue el que obtuvimos al someter a choque térmico a los embriones de nuestra línea

de sobreexpresión (Figura 35A). Por el contrario, la inyección de ARN mensajero de la versión dominante negativa da lugar a la cefalización del embrión (Winkler and Moon, 2001). Este fenotipo fue el que encontramos nosotros al someter a choque térmico a las dos líneas que generamos para interferir con la función del gen wild type (Figura 35B). Una de ellas llevaba una versión dominante negativa y la otra llevaba el dominio de unión a midkine del receptor LRP1. Ambas habían sido utilizadas con éxito en pez cebra y en ratón respectivamente (Chen et al., 2007; Winkler and Moon, 2001). Al analizar el fenotipo de los transgénicos de pérdida de función de *synd2*, observamos que éstos tenían graves problemas en la disposición del eje del cuerpo a 2dpf. Los embriones estaban totalmente curvados y todo el cuerpo permanecía unido al saco, mientras que en los controles únicamente la zona pectoral-abdominal estaba en contacto (Figura 35C). Este fenotipo era mucho más fuerte que el de los embriones inyectados

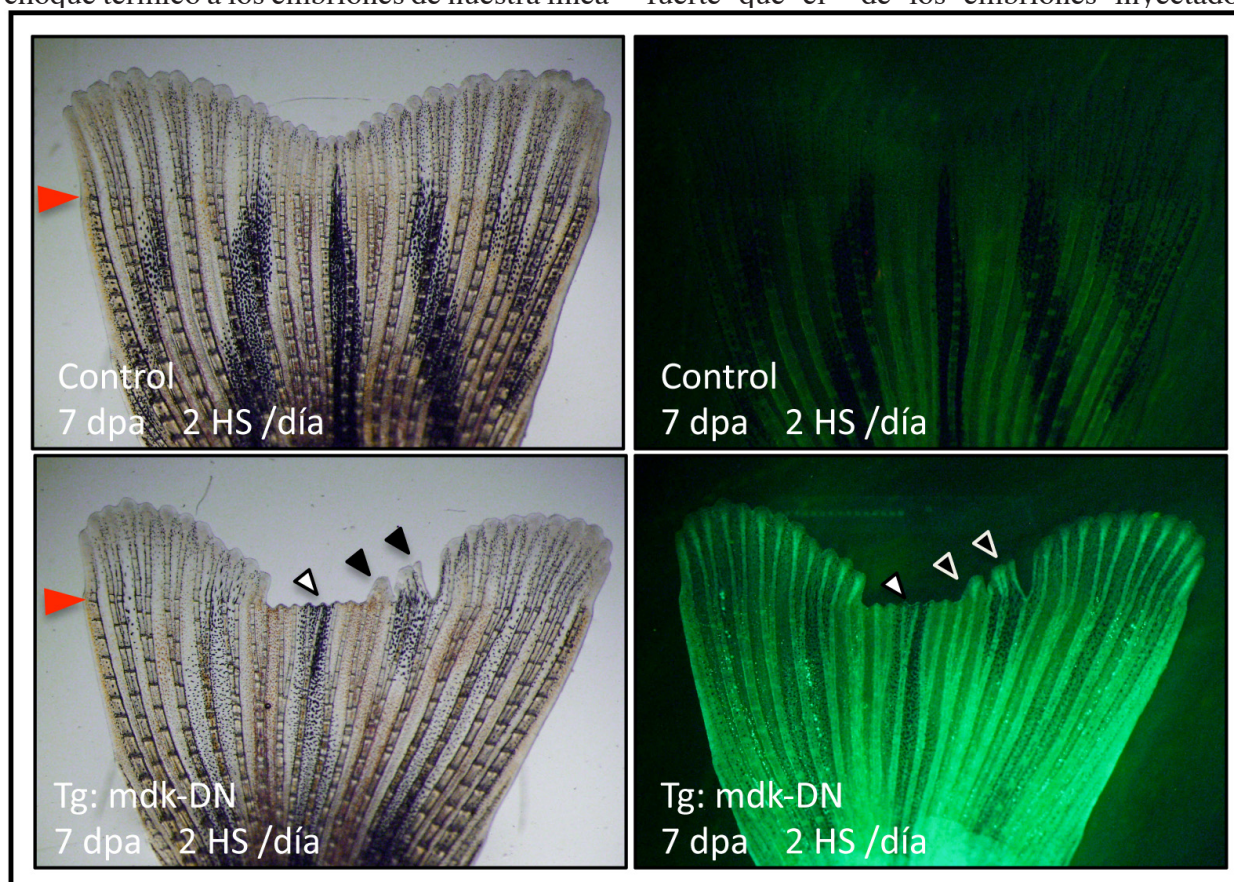


Figura 36. Mdk se requiere para el establecimiento y especificación del blastema durante la regeneración de la aleta. La sobreexpresión del dominante negativo de *mdka* afecta a la regeneración de la aleta. Alrededor del 50% de los peces muestran graves defectos en la regeneración con varios radios que no han sido capaces de formar el blastema (flecha blanca) o muestran defectos en el crecimiento (flechas negras). Las flechas rojas marcan el plano de amputación.

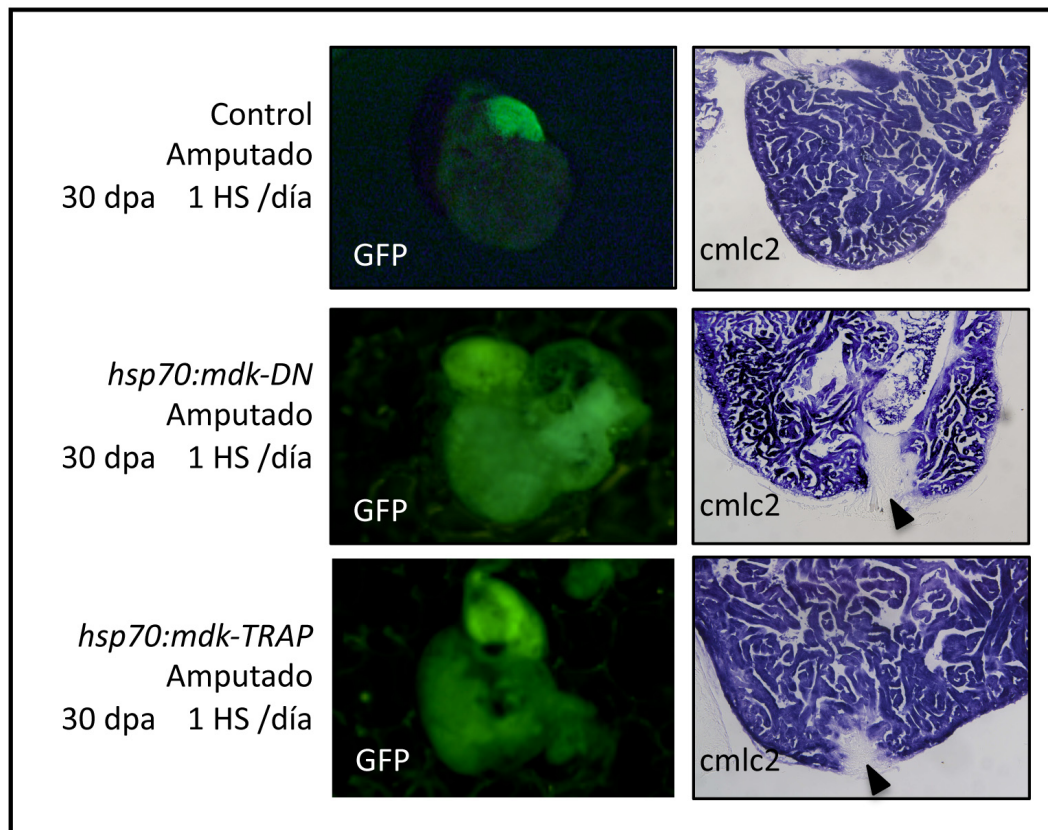


Figura 37. La inhibición de mdka afecta a la regeneración del corazón tras la amputación. La inhibición de la señalización por mdka en las líneas transgénicas *hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP* durante la regeneración del corazón en el modelo de amputación, bloquea el proceso dejando una zona no regenerada (señalada por la flecha) que no expresa *cmlc2*.

con un MO contra *synd2* (Arrington and Yost, 2009). El fenotipo de los transgénicos de pérdida de función de *cav-1*, era muy similar al que muestra un embrión al ser inyectado con un MO dirigido contra *cav-1* (Figura 35C). La inyección del MO da lugar a graves defectos en el desarrollo de la notocorda y una disminución en la longitud en el eje antero-posterior (Fang et al., 2006; Nixon et al., 2007). Estos mismos defectos eran los que observábamos al inducir por choque térmico la expresión del transgén dominante negativo.

7.2 Ensayos funcionales con líneas transgénicas durante la regeneración de la aleta: el papel de mdka en la regeneración.

Nuestro siguiente paso fue analizar que ocurría al someter a las líneas transgénicas a choque térmico durante la regeneración de la

aleta en individuos adultos. Sorprendentemente, la única línea que presentó defectos en la regeneración de la aleta al someter a los animales a ciclos de 1 hora de choque térmico dos veces al día fue la *hsp70: mdk-DN*. Alrededor de la mitad de los peces de esta línea presentaban claros defectos en la regeneración de la aleta después de una semana de amputación. El defecto que observamos fue que los animales transgénicos no eran capaces de regenerar varios de los radios de la aleta (Figura 36). Los radios que no regeneraban no eran capaces de formar el blastema y únicamente estaban recubiertos por la epidermis de la herida.

El resto de las líneas mostraban muy poca expresión del reportero *egfp* en la aleta, no así en los otros tejidos. Por tanto, no podemos concluir que la falta de un fenotipo tras la inducción de los transgenes durante la regeneración se debiera a que no eran necesarios durante el proceso.

7.3 Ensayos funcionales llevados a cabo con las líneas transgénicas establecidas durante la regeneración del corazón: mdka, syndecan-2 y caveolina-1.

A continuación, decidimos analizar si durante la regeneración del corazón (modelo de amputación) la sobreexpresión de los dominantes negativos para *mdka* tenía algún efecto. Para ello operamos y pusimos a regenerar animales control y transgénicos de pérdida de función de *mdka* (*hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP*) en peceras donde subía una vez al día la temperatura del agua desde 28°C hasta 38°C. Esta temperatura se mantenía durante 90 minutos. Tras un mes regenerando, sacrificamos los peces, fijamos los corazones y analizamos mediante ISH la expresión de *cmlc2*. *cmlc2* se ha utilizado con anterioridad para marcar el miocardio que ha regenerado o está intacto (expresa *cmlc2*) y distinguirlo del miocardio dañado/no regenerado (no expresa *cmlc2*) (Lepilina et al., 2006). Los corazones

pertenecientes a los animales del grupo control expresaban *cmlc2* en todo el corazón. Sin embargo, los animales transgénicos (*hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP*) donde habíamos interferido la señalización a través de Mdk mostraban una zona en el ápice del ventrículo que no expresaban *cmlc2* (Figura 37). Esto nos indicaba que la regeneración se había inhibido.

A continuación analizamos si la señalización a través de mdka afectaba a la proliferación de los cardiomiocitos, las células responsables de la regeneración del corazón (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). Para ello obtuvimos corazones de animales control y transgénicos (*hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP*) que habían estado regenerando durante 7 días y a los que se les había dado un choque térmico diario y analizamos la proliferación mediante IHF para el marcador de proliferación PCNA. Mientras que la tasa de proliferación de los cardiomiocitos cercanos al plano de amputación en animales del grupo control era

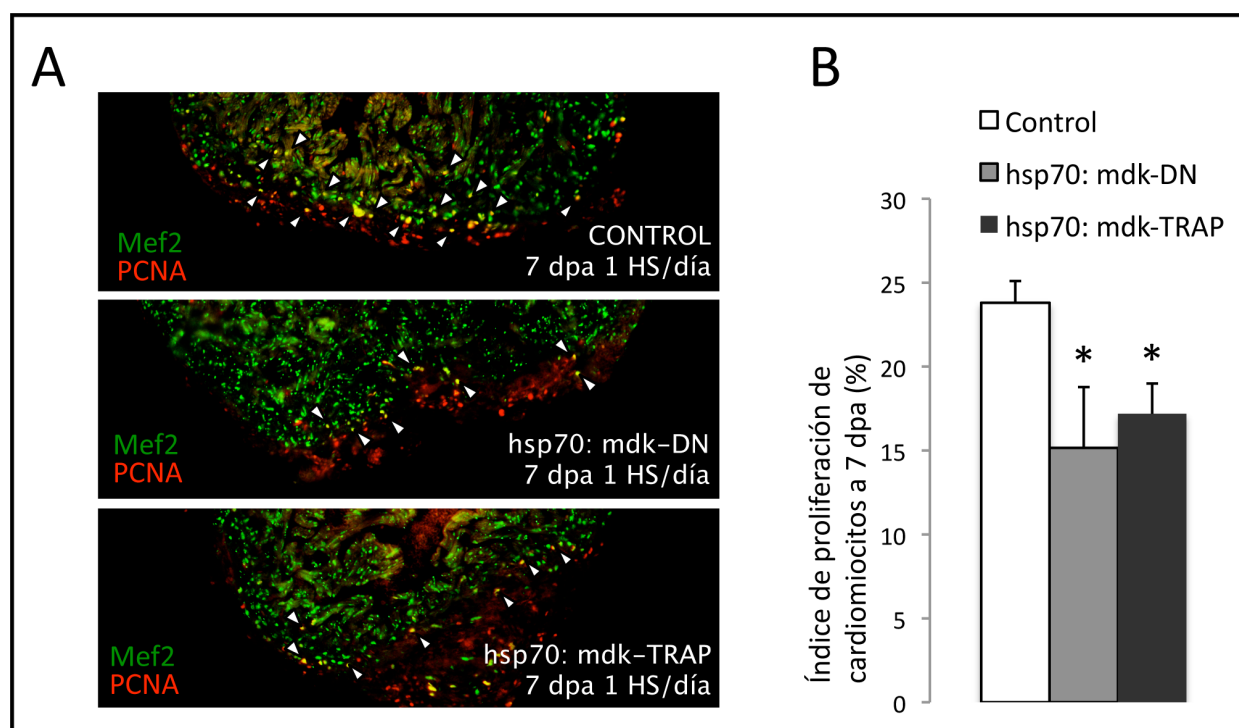


Figura 38. La inhibición de mdka afecta a la proliferación de los cardiomiocitos durante la regeneración. (A) Análisis de células doble-positivas (flechas blancas) para el marcador de proliferación PCNA (en rojo) y el marcador de cardiomiocitos Mef2 (en verde) en corazones de animales control y de falta de función de mdka (*hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP*) tras 7 días regenerando y con un coque térmico (HS) diario. (B) Cuantificación del porcentaje de cardiomiocitos en proliferación en animales control, *hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP*. (*: nivel de significación > 0.025).

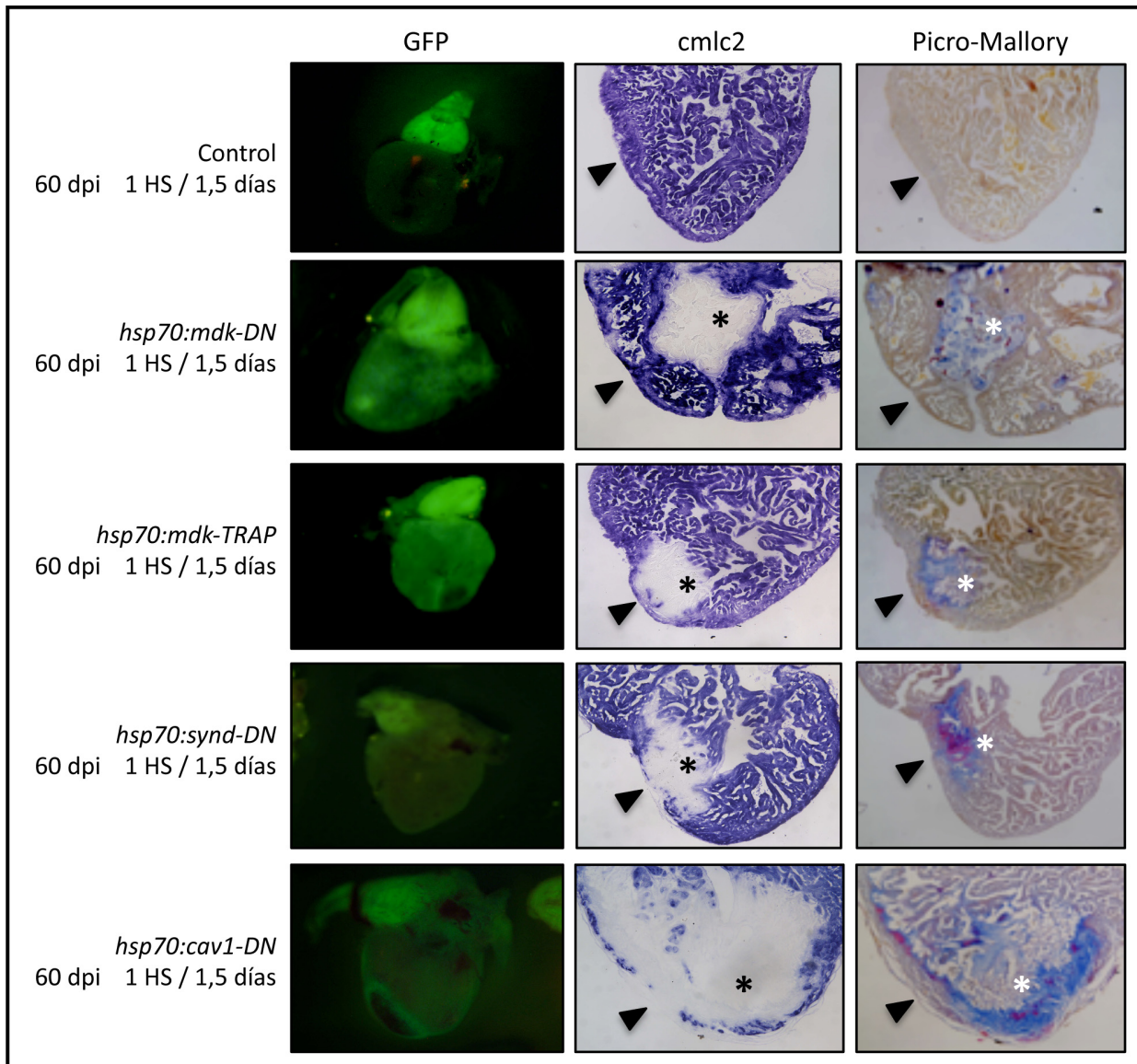


Figura 39. La inhibición de mdka o syndecan-2 o caveolina afecta a la regeneración del corazón.

El bloqueo de la señalización a través de mdka (*hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP*) o de syndecan (mediante la inducción de un dominante negativo en la línea transgénica *hsp70: synd-DN*) o de caveolina (*hsp70: cav1-DN*) hace que el corazón no regenere. Aparece una gran zona (asterisco negro) donde no se expresa el marcador de miocardio maduro/sano *cmlc2*. Esta zona no regenerada (asterisco blanco) está formada por colágeno (azul) y fibrina (rojo). La zona donde se produjo el crioinfarto está señalada por una flecha negra. Los paneles de la izquierda muestran la expresión del reportero GFP.

alrededor del 24%, en los animales de las dos líneas transgénicas el porcentaje caía hasta el 17% (nivel de significación > 0.025) (Figura 38). Este defecto en la proliferación podría estar explicando en parte el hecho de que las líneas *hsp70: mdk-DN* y *hsp70: mdk-TRAP* no sean capaces de completar la regeneración tras el periodo de un mes.

Decidimos analizar que ocurría durante la regeneración en el modelo de crioinfarto. Tras 60 días de producirse la criolesión, los corazones

de los animales del grupo control expresaban el marcador *cmlc2* por todo el miocardio. Por el contrario, los animales transgénicos (*hsp70: mdk-DN*) mostraban un gran área en su interior donde estaba ausente. Esta zona que no expresaba *cmlc2* estaba en el interior del corazón y rodeada de una capa de miocardio que sí expresaba *cmlc2*. (Figura 39). Lo mismo ocurría en los corazones de los animales de la otra línea transgénica de pérdida de función de mdk que hemos generado (*hsp70: mdk-Trap*). Tras 60 dpi presentaban en su interior una gran

zona que no expresaba el marcador de miocardio maduro *cmlc2* (Figura 39). Al hacer la tinción de Picro-Mallory para secciones consecutivas de estos mismos corazones observamos que los corazones del grupo control no presentaban depósitos de fibrina ni de colágeno. Por el contrario, en los animales transgénicos, la zona no regenerada estaba compuesta en su mayor parte por colágeno y en una pequeña parte de fibrina. Lo que indica que no han sido capaces de resolver la cicatriz de colágeno/fibrina que se poduce después de la lesión (Gonzalez-Rosa et al., 2011).

Al analizar la implicación funcional de syndecan-2 durante la regeneración del corazón en el modelo de crioinfarto, observamos que se repetían los resultados que habíamos obtenido con los transgénicos de *mdk*. Al igual que ocurría en los casos anteriores, los animales transgénicos *hsp70: synd2-DN* no eran capaces de regenerar el corazón. De nuevo encontramos una amplia zona del ventrículo que no expresaba *cmlc2* (Figura 39). Además, en este caso esta zona llegaba hasta la parte más externa del corazón. La herida no había sido rodeada por una capa de miocardio maduro como en los casos anteriores. De nuevo el área no regenerada

estaba compuesta por colágeno y por fibrina. Aunque aquí la proporción de fibrina frente a colágeno era bastante mayor.

En el caso de los animales que sobre-expresaban la versión dominante negativa de *Cav-1* (*Tg(hsp70: Cav1-DN)*) observamos el mismo fenotipo de ausencia de expresión del marcador *cmlc2* en el área infartada tras 60 días regenerando. La regeneración en estos animales había sido inhibida. Al igual que en el caso anterior la herida no había sido rodeada en su totalidad por una capa de miocardio maduro (Figura 39) y de nuevo encontramos que el área no regenerada estaba compuesta mayoritariamente por colágeno y fibrina que no habían sido reabsorbidos y dan lugar a la formación de una gran cicatriz (Figura 39).

7.3.1 Posición de Mdka en la cascada de señalización durante la regeneración del corazón. Relación con raldh2.

Teniendo en cuenta que el RA juega un papel fundamental durante la regeneración de la aleta y del corazón (Kikuchi et al., 2011b;

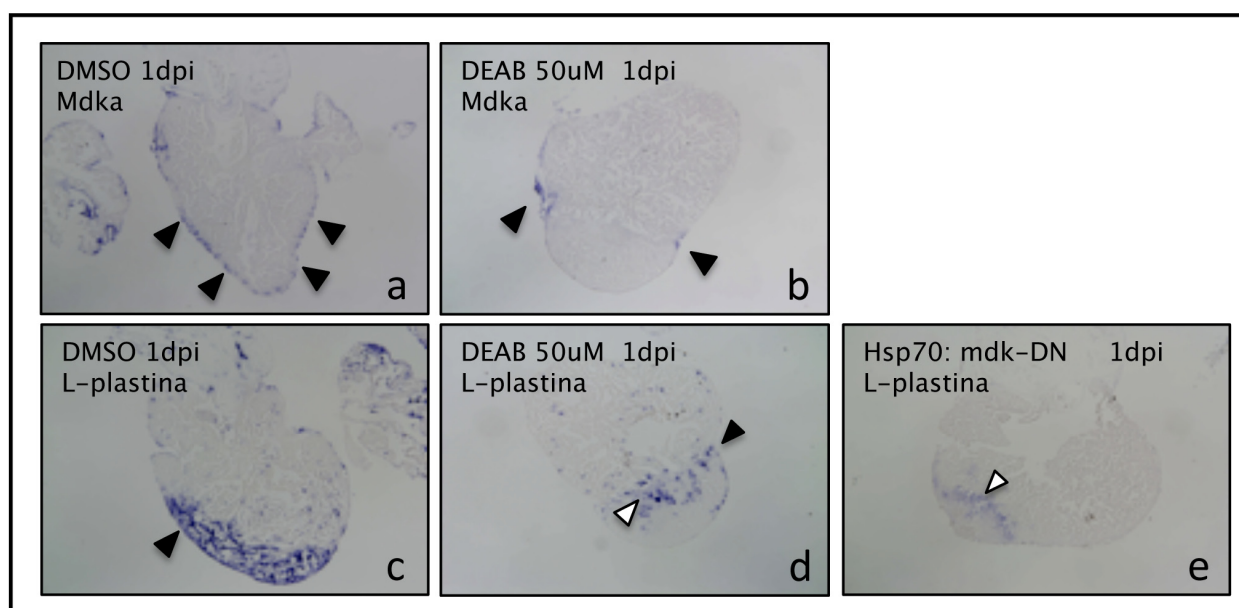


Figura 40. La expresión de mdka durante la regeneración del corazón está en parte controlada por la señalización a través de ácido retinoico (RA). (a,b) La inhibición farmacológica de la señalización por RA apaga casi por completo la expresión de mdka. (c, d, e) La inhibición farmacológica de la señalización por RA y la inhibición de la señalización por Mdk (en el transgénico *hsp70: mdk-DN*) da lugar a una menor infiltración de macrófagos (marcados por L-plastina).

Resultados

Mathew et al., 2009) y que la expresión de *mdka* está regulada en distintos sistemas por RA (Matsubara et al., 1994; Muramatsu, 2002), analizamos mediante ISH los niveles de expresión de *mdka* tras inhibir farmacológicamente la acción del RA durante los dos procesos. Para ello, crioinfantamos varios peces, los dividimos

en dos grupos y los dejamos regenerar durante un día. Uno de los grupos se puso a regenerar en agua que contenía DEAB a una concentración de 50 μ M y que ya habíamos visto que inhibía la regeneración de la aleta. El grupo control se puso a regenerar en agua que contenía únicamente DMSO. A 1dpa, los corazones de

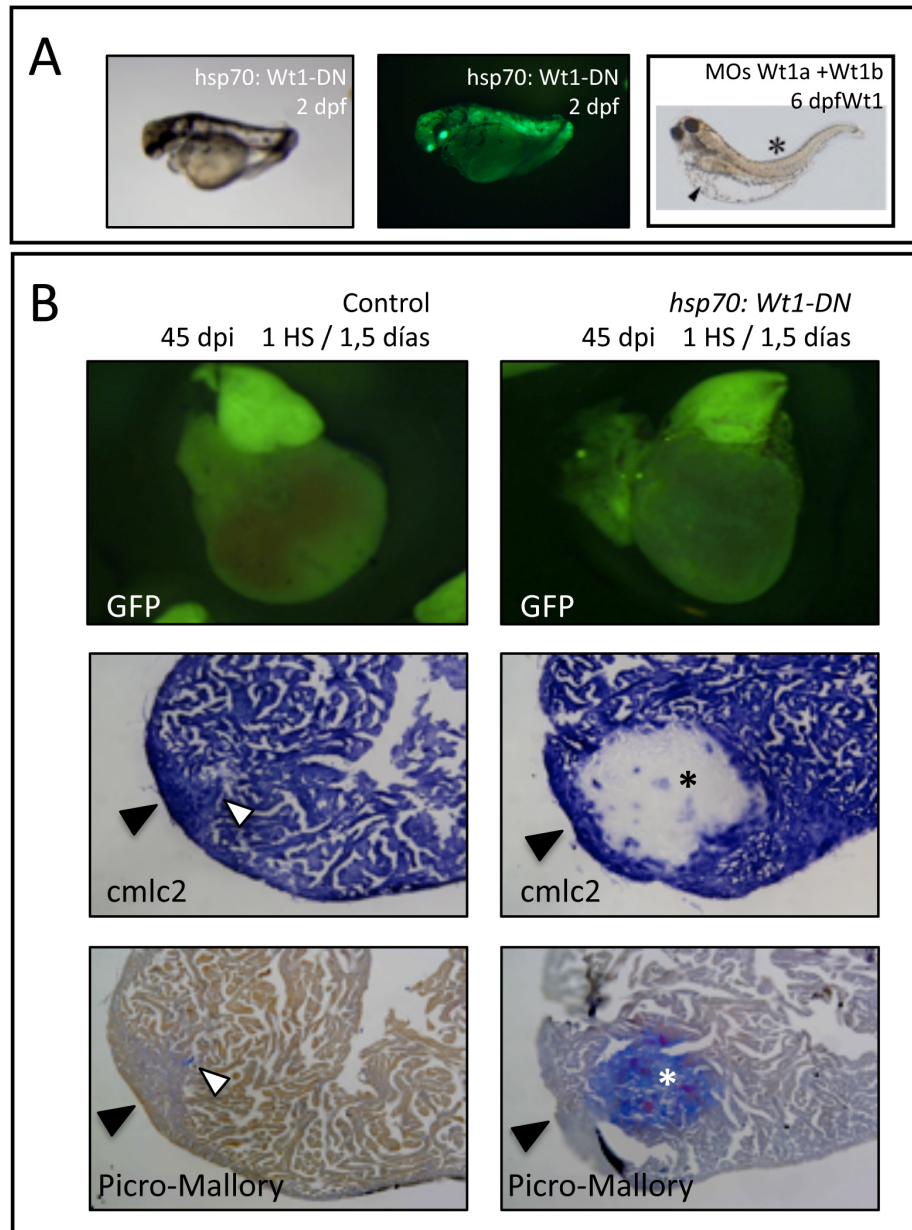


Figura 41. La inhibición de la señalización a través de Wt1 impide la regeneración. (A) La inhibición de la señalización dependiente de Wt1 a través de la sobreexpresión de un dominante negativo en la línea transgénica *hsp70: wt1-DN* afecta al desarrollo embrionario y da lugar a un fenotipo similar al descrito para la inyección de los MO contra *wt1a* y *wt1b*. El panel de la derecha está extraído de (Perner et al., 2007). (B) La sobreexpresión de un dominante negativo de Wt1 (con la línea transgénica *hsp70: wt1-DN*) inhibe la regeneración cardíaca. A 45 dpi observamos una gran zona en el ventrículo que no expresa el marcador de miocardio maduro *cmlc2* (asterisco negro). Por el contrario, el control ha sido capaz de regenerar. Solo queda un ensanchamiento de la pared ventricular que nos indica donde se produjo la criolesión (flechas negra y blanca). El área no regenerada (asterisco blanco) está compuesta por colágeno (azul) y algo de fibrina (rojo). En el control se observa algo de colágeno en la zona donde se produjo la criolesión (flecha blanca). Los paneles superiores muestran la expresión del reportero EGFP.

los peces que estuvieron en agua con DMSO expresaban *mdka* con el mismo patrón que ya hemos descrito anteriormente (ver Figura 23C). *Mdka* se expresaba por todo el epicardio de las dos cámaras del corazón (Figura 40a). Por el contrario, la expresión de *mdka* en el corazón de los peces que habían estado en el tanque con DEAB estaba visiblemente disminuida. Únicamente vimos expresión en el epicardio que estaba más cerca de la zona infartada (Figura 40b).

Sabiendo que tanto *Raldh2* como *Mdka* están implicados en el reclutamiento e infiltración de células del sistema inmune, analizamos mediante ISH la infiltración de macrófagos durante la regeneración del corazón, un día después de producir el crioinfarto. En los corazones de los peces que habían regenerado en agua suplementada con DMSO, toda la zona del infarto estaba infiltrada por macrófagos que expresaban el marcador *L-plastina* (Figura 40c). Además, también se veían macrófagos dispersos por el ventrículo y en la aurícula. Sin embargo, en los peces que habían regenerado en agua suplementada con DEAB el número de macrófagos detectado mediante la ISH del marcador *L-plastina*, era mucho menor (Figura 40d). Aparecían solamente en la zona de contacto entre la zona lesionada y la zona sana. Al analizar el patrón de expresión de *L-plastina* a 1dpi en los transgénicos de pérdida de función de *Mdk*, vimos que la expresión de *L-plastina* era algo más baja que en los peces control (regenerados en agua con DEAB) (Figura 40e) y, al igual que en los tratados con DEAB, sólo estaba presente en la zona de contacto entre el tejido sano y el dañado.

A partir de estas observaciones podemos concluir que ambos están implicados en la respuesta inflamatoria tras daño cardíaco y que la expresión de *mdka* esta regulada, al menos en parte, por RA.

7.3.2 Posición de *Mdka* en la cascada de señalización durante la regeneración del corazón. Relación con *Wt1*.

El promotor de *mdka* tiene sitios de

unión para el gen supresor del tumor de Wilms (*wt-1*) del que es una diana directa (Adachi et al., 1996). *Wt-1* es un factor de transcripción de dedos de zinc que está inactivado en un subgrupo de los tumores de Wilms (Wagner et al., 2003). Durante el desarrollo se expresa en gran cantidad de órganos y tejidos, entre ellos en el corazón (Wagner et al., 2003). Durante el desarrollo de este último se expresa en el epicardio y se ha sugerido su implicación en la TEM del epicardio para dar lugar a progenitores cardíacos que después se diferenciarán en varios tipos celulares como músculo liso de coronarias y endotelio, fibroblastos perivasculares e intersticiales (Martinez-Estrada et al.; Zhou et al., 2008). *Wt1* regula también la señalización a través de RA (ya hemos descrito con anterioridad el papel fundamental que tiene durante el desarrollo cardíaco) mediante la activación transcripcional de *Raldh2* (Guadix et al., 2011). Además *Wt1* se expresa y participa en la regeneración del corazón del pez cebra (Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011), y de ratones tanto recién nacidos (Porrello et al., 2011) como de adultos (Smart et al., 2011). En el corazón adulto se sabe que las células del epicardio que inducen la expresión de *wt1* van a dar lugar a progenitores cardíacos que repararán el corazón dañado (Smart et al., 2011). Teniendo en cuenta esta información, quisimos analizar la implicación funcional de *Wt1* durante la regeneración del corazón de pez cebra, así como su relación con *Raldh2* y *Mdka*. Para ello, hemos generado un transgénico de pérdida de función de *Wt1* en el que una versión dominante negativa de *Wt-1* se expresa bajo el control del promotor *hsp70*. La versión dominante negativa que hemos utilizado había sido descrita con anterioridad y utilizada con éxito en cultivos celulares (Han et al., 2007). La inducción del dominante negativo en la línea transgénica (*hsp70: wt1-DN*) afectaba el desarrollo y daba lugar a un fenotipo parecido al descrito para la inyección conjunta de los MO contra *wt1a* y *wt1b* (Perner et al., 2007) (Figura 41A). Los embriones mostraban a 2 dpf una gran curvatura del eje del cuerpo, distensión del pericardio y edema. Estos mismos defectos han sido descritos para la inyección conjunta de

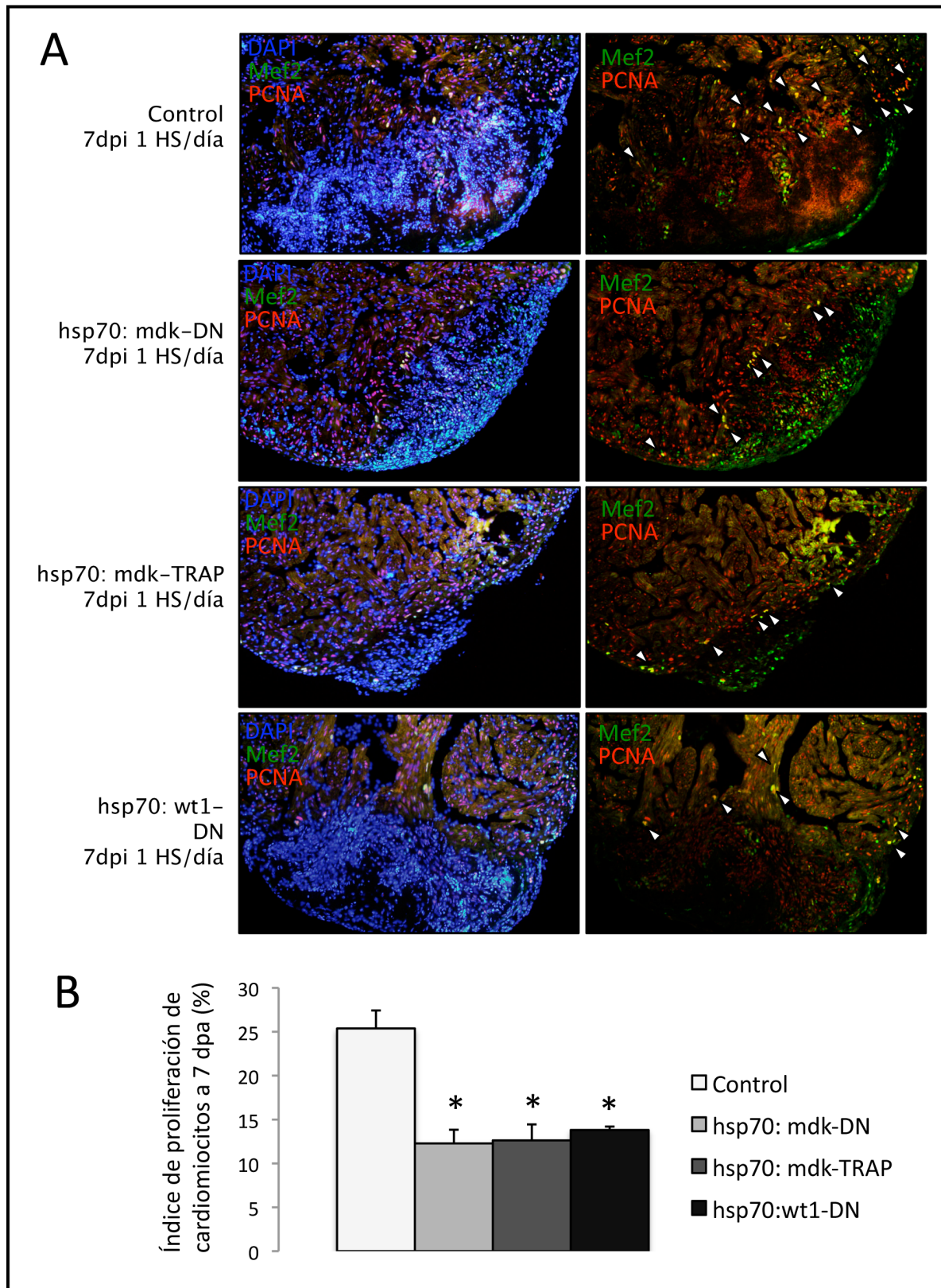


Figura 42. La inhibición de mdka y de wt1 afecta a la proliferación de los cardiomiocitos durante la regeneración en el modelo de criolesión. (A) Análisis de células doble-positivas (flechas blancas) para el marcador de proliferación PCNA (en rojo) y el marcador de cardiomiocitos Mef2 (en verde) en corazones de animales control y de falta de función de mdka (hsp70: mdk-DN y hsp70: mdk-TRAP) o de wt1 (hsp70: wt1-DN) tras 7 días regenerando y con un choque térmico (HS) diario. En la imagen de la izquierda se aprecia el infarto fácilmente reconocible por la gran agrupación de núcleos celulares marcados con DAPI (azul). (ci: crioinfarto) **(B)** Cuantificación del porcentaje de cardiomiocitos en proliferación en animales control, hsp70: mdk-DN, hsp70: mdk-TRAP y hsp70: wt1-DN (*: nivel de significación > 0.025).

un MO contra *wt1a* y otro contra *wt1b*, lo que indicaba que éramos capaces de interferir con la función de los dos genes, ya que la inyección por separado de cada MO no es capaz de reproducir el fenotipo de la inyección conjunta (Perner et al., 2007).

Hemos analizado cómo era la regeneración de un crioinfarto en estos peces, y la hemos comparado con animales control que fueron sometidos a los mismos ciclos de choque térmico. Hemos visto que tal y como ocurría en los casos anteriormente descritos los animales transgénicos presentaban a 45 dpi una gran zona del ventrículo que no expresaba el marcador de miocardio maduro *cmlc2* (Figura 41B). Los controles por el contrario habían sido capaces de regenerar por entero el infarto aunque la zona donde se había producido la lesión quedaba marcada por un ensanchamiento de la pared del ventrículo y un pequeño depósito de colágeno (Figura 41B). Al hacer la tinción de Picro-Mallory observamos un gran depósito de colágeno con algo de fibrina que solapaba con el área que no expresaba *cmlc2*. Esto nos indicaba que los animales *hsp70: wt1-DN* no habían sido capaces de regenerar el infarto y resolver la cicatriz.

A continuación analizamos si la señalización a través de *Mdka* o *Wt1* afectaba a la proliferación de los cardiomiocitos durante la regeneración en el modelo de crioinfarto. Para ello obtuvimos corazones de animales control y transgénicos (*hsp70: mdk-DN*, *hsp70: mdk-TRAP* y *hsp70: wt1-DN*) que habían estado regenerando durante 7 días y a los que se les había dado un choque térmico diario y analizamos la proliferación mediante IF para el marcador de proliferación PCNA (**Figura 42A**). Mientras que la tasa de proliferación de los cardiomiocitos cercanos al área infartada en animales del grupo control era alrededor del 25%, en los animales de las dos líneas transgénicas de falta de función de *Mdk* el porcentaje caía hasta la mitad (en torno al 12%, nivel de significación > 0.025) (**Figura 42B**). Lo mismo ocurría en la línea *hsp70: wt1-DN* donde el índice de proliferación de cardiomiocitos cercanos al infarto era del 13%.

De nuevo, y al igual que en el caso del modelo de amputación, este defecto en proliferación podría estar explicando en parte el hecho de que las líneas *hsp70: mdk-DN*, *hsp70: mdk-TRAP* y *hsp70: wt1-DN* no sean capaces de completar la regeneración.

Actualmente, estamos caracterizando los fenotipos en regeneración aquí mostrados durante la regeneración en los transgénicos generados así como la relación entre los distintos genes y su posición en la secuencia de señalización.

DISCUSIÓN

La regeneración es un proceso complejo que requiere la activación y el funcionamiento coordinado de distintos mecanismos moleculares, cuya regulación ha de estar finamente controlada. En este trabajo nos hemos centrado en el análisis del perfil de expresión génica durante la regeneración del corazón y de la aleta en el pez cebra, con el fin de identificar y estudiar la función de nuevos genes implicados en ambos procesos.

1. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL CORAZÓN.

Al comenzar este trabajo en el laboratorio no teníamos ninguna experiencia previa con el pez cebra. Tampoco habíamos trabajado anteriormente en el campo de la regeneración. Por ello, una parte importante del tiempo empleado en la realización de esta tesis se dedicó a poner a punto los modelos de regeneración de la aleta y del corazón en el pez cebra, así como las técnicas experimentales utilizadas. El modelo de regeneración de la aleta caudal había sido descrito con anterioridad, era fácilmente reproducible y existían varios trabajos al respecto. Sin embargo, al comienzo de esta tesis únicamente se habían publicado dos trabajos relativos a la regeneración del corazón en pez cebra (Poss et al., 2002b; Raya et al., 2003). Hemos sido capaces de establecer los modelos de amputación de la aleta y del ápice del ventrículo del corazón. Hemos utilizado estos modelos para analizar los perfiles de expresión génica durante la regeneración del corazón y de la aleta, con objeto de identificar nuevos genes que pudieran jugar un papel relevante en estos procesos.

La regeneración de la aleta se completa en un plazo de 7-10 días, y su última fase es el crecimiento regenerativo, que comienza en torno a las 36-48 hpa (Poss et al., 2003). Hemos analizado el perfil de transcripción a 12, 24, 48

y 72 hpa porque examinando estos tiempos nos centrábamos en las fases iniciales del proceso, a la vez que abarcamos las 3 fases en las que se divide la regeneración de la aleta (Poss et al., 2003). De los 4 puntos analizados, únicamente el último correspondía claramente a la fase de crecimiento regenerativo.

Por la misma razón, hemos elegido 12 hpa, 1, 3 y 7 dpa para analizar el transcriptoma de la regeneración del corazón. En este tejido, el proceso se completa en 30 días y se ha observado una fase de proliferación máxima en torno a los 14 dpa (Poss et al., 2002b). En nuestro análisis, al igual que para el caso de las aletas, nos estábamos centrando en las primeras fases porque pensamos que es cuando tiene lugar la señalización encargada de detectar el daño y disparar el proceso. Creemos que los tiempos analizados en el caso del corazón se corresponden aproximadamente con los de la regeneración de la aleta. En las primeras 24 horas tiene lugar la detección del daño y la activación de los mecanismos regenerativos. Cabe la posibilidad de que al igual que ocurre en el primordio de la aleta de las larvas (Niethammer et al., 2009; Rieger and Sagasti, 2011), exista un mecanismo dependiente de peróxido de hidrógeno, si bien es cierto que no hemos abordado esta cuestión en nuestro estudio. Al respecto sólo podemos decir que la oxidasa dual, una de las enzimas requeridas y responsables del establecimiento del gradiente de H_2O_2 (Niethammer et al., 2009; Rieger and Sagasti, 2011), no estaba entre los genes representados en el microarray. Por otro lado, estaba y hemos identificado en el microarray uno de los genes propuesto como candidato a disparar el proceso a través de la señalización por ácido retinoico, *raldh2* (Kikuchi et al., 2011b). Hemos visto que *raldh2* se expresaba muy tempranamente tanto en la regeneración del corazón como de la aleta, y hemos validado su implicación funcional mediante el uso de inhibidores farmacológicos y de un MO, durante la regeneración de la aleta. El papel de *raldh2* será discutido más adelante en esta misma sección.

1.1 Análisis conjunto de las regeneraciones del corazón y de la aleta.

Hemos identificado en el análisis de los resultados del microarray 308 transcritos que estaban presentes en todos los tiempos (incluidos los controles), que cambiaban en el menos 3 de los cuatro tiempos en cada proceso regenerativo y que fuera al menos en uno de ellos $\geq +1$ o ≤ -1 en base logarítmica 2. Somos conscientes que de esta manera podemos no haber detectado gran cantidad de genes que comunes a los dos procesos de regeneración, pero que sólo cambien en uno o dos de los puntos analizados. Sin embargo, también podemos argüir que la identificación de genes cuya expresión solo cambiase en 1 ó 2 puntos de los 4 era a priori, menos interesante. Es cierto que no creemos que nuestros criterios de búsqueda sean los más adecuados para identificar genes específicos de una única fase de la regeneración (utilizando las fases de la aleta, ya que para el corazón aunque sea un proceso similar, no se han descrito "fases"). Creemos que la gran mayoría de genes identificados están implicados en al menos dos de las fases de la regeneración de la aleta.

Cabe señalar el hecho de que al hacer el análisis ontológico de los 308 genes identificados y compartidos entre ambos procesos, hayamos encontrado una gran cantidad de genes de la matriz extracelular y de respuesta a estrés. En el caso de estos últimos, todos estaban aumentados en todos los tiempos en el microarray. Parece obvio que los genes de respuesta a estrés estén inducidos tras sufrir una amputación, ya sea de la aleta o del ápice del ventrículo. Con respecto a los genes relacionados con la matriz extracelular, podemos decir que ésta juega un papel muy importante durante los dos procesos. Se sabe que la matriz extracelular no es únicamente importante para el establecimiento de un armazón sobre el que migren o crezcan los distintos tipos celulares, si no que también tiene un papel señalizador que regula el proceso de reparación de heridas y de cicatrización (Schultz et al.; Widgerow, 2011; Yates et al.).

Hemos visto que los 308 genes pueden agruparse en cuatro grandes grupos atendiendo a su patrón temporal de expresión. El grupo más numeroso era el formado por genes cuya expresión aumentaba durante ambos procesos. Esto indicaba que se requiere su acción durante el proceso y que estarían desempeñando funciones parecidas en ambos. Es por eso que los genes que hemos validado se encuentran en su mayoría en este grupo. De los grupos restantes uno estaba formado por genes cuya expresión estaba disminuida tanto en la regeneración de la aleta como la del corazón. Esto sugiere que los genes incluidos en él no son requeridos durante el proceso. También pudiera ser que se necesite que no estén actuando para que la regeneración tenga lugar. Los otros dos grupos estaban formados por genes que se comportaban de manera distinta en la regeneración de la aleta y del corazón. En uno de ellos sus niveles de transcripción estaban aumentados en la regeneración del corazón y disminuidos en la de la aleta. En el otro ocurría exactamente lo contrario. En cualquier caso esto nos sugería que los genes estarían desempeñando funciones antagónicas.

1.2 Análisis in silico del transcriptoma obtenido para la regeneración del corazón.

Hemos analizado independientemente el perfil de expresión durante la regeneración del corazón y hemos identificado 818 genes presentes en todos los tiempos, cuya expresión cambia en al menos tres y que el cambio en base logarítmica 2 con respecto al control es al menos en uno de los 4 tiempos ≥ 1 ó ≤ -1 . De esta manera, hemos identificado 510 genes más que no habíamos identificado previamente en el análisis conjunto. Hay que destacar la presencia de numerosos genes pertenecientes a la homeostasis y al desarrollo del corazón, cuya transcripción disminuye durante el proceso. Estos resultados son compatibles con la observación de que los cardiomiocitos se desdiferencien durante el proceso para entrar en ciclo, proliferar y finalmente volver

a diferenciarse (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). Así, los genes de la cadena ligera de la miosina cardíaca, de la cadena pesada de la miosina ventricular, de la proteína c de unión a miosina cardíaca y el factor 2a de aumento de miocitos (myocyte enhanced factor 2a), todos ellos implicados en la contracción cardíaca (Hinitz and Hughes, 2007; Wang et al., 2005), se reprimen durante estas primeras fases de la regeneración (12 hpa a 7dpa), que es cuando los cardiomiocitos comienzan a desdiferenciarse (Jopling et al., 2010; Kikuchi et al., 2010). También hemos visto que hay un enriquecimiento de genes correspondientes al proteosoma, al lisosoma e implicados en la respuesta a estrés. Estos resultados parecen indicar que el reciclaje de estructuras celulares, así como el correcto plegamiento de nuevas proteínas va a tener una importancia capital durante los primeros días de la regeneración.

1.3 Análisis in silico del transcriptoma obtenido para la regeneración de la aleta.

Hemos analizado independientemente el transcriptoma de la regeneración de la aleta a distintos días y hemos identificado 1.522 genes presentes en todos los tiempos analizados, cuya expresión cambia en al menos tres y que el cambio en base logarítmica 2 con respecto al control es al menos en uno de los 4 tiempos ≥ 1 ó ≤ -1 . Hemos observado que existe un enriquecimiento en genes que implicados en el ciclo celular y su regulación, lo cual era esperable debido a la alta tasa de proliferación que se registra durante la regeneración a partir de 24-36 hpa. Entre estos genes se encontraban los que codifican para las kinasas polo-like 1, 2 y 3. En el caso de *polo-like 1*, aumenta su transcripción durante la regeneración del corazón y es necesaria para que esta tenga lugar (Jopling et al., 2011; Sleep et al., 2010). Nuestros datos muestran que durante la regeneración de la aleta también se induce su expresión, lo que sugiere que al igual que en la regeneración del corazón, juega un papel en el proceso. Sin embargo, la expresión de *polo-like kinasa 2* y

3 disminuye en todos los tiempos respecto al control. Lo mismo ocurre con la expresión de *p63*. *p63* está implicado en la estratificación del ectodermo durante la formación de la cresta apical ectodérmica (AER) durante el desarrollo de la extremidad, así como en la regeneración de la misma (Kawakami et al., 2006).

Por otro lado, hemos observado que existe un enriquecimiento en genes relacionados con la muerte celular y su regulación. Entre estos genes hay varios pertenecientes a la familia *BCL2* y que son inductores de apoptosis (Wyllie). Hay que señalar que la gran mayoría de ellos parecen estar reprimidos durante la regeneración de la aleta, lo que sugiere una señalización. Recientemente se ha descrito la necesidad de la señalización por RA para la inhibición de la apoptosis de las células del blastema maduro durante la regeneración de la aleta.

Por último, al hacer el análisis en base a la función anotada para los genes identificados, hemos identificado varios genes implicados previamente en la regeneración y anotados como tales. Entre estos genes están los genes marcadores de blastema *msxB*, *msxC*, *hsp60* y *activina*. Este hecho nos indica que la aproximación utilizada es válida ya que nos permite identificar genes cuya implicación en regeneración se ha mostrado previamente.

2. VALIDACIÓN POR qPCR Y/O POR ISH DE GENES COMUNES A LA REGENERACIÓN CARDÍACA Y DE LA ALETA.

2.1 Genes relacionados con la matriz extracelular: fibronectina 1b, integrina α 5, periostin, ctgf y keratina 18.

Como hemos dicho anteriormente, un gran número de genes cuya expresión aumentaba durante la regeneración cardíaca o de la aleta estaban relacionados con la ECM. Esto sugería

que durante el proceso regenerativo va a tener una gran importancia la deposición y remodelación de la ECM. Hemos identificado y validado el aumento de la expresión de *fibronectina 1b* e *integrina α 5* durante la regeneración de la aleta y del corazón. Fibronectina es una de las proteínas más abundantes e importantes de la ECM mientras que *itg α 5* es el receptor celular prototípico de fibronectina. El aumento de la expresión de ambos sugiere de nuevo una gran importancia de la ECM durante ambos procesos regenerativos. Sus patrones de expresión durante la regeneración son muy similares. Al contrario que los de otros genes aquí descritos, están localizados desde un primer momento en la zona dañada, tanto en aletas como en corazón, si bien es verdad que ésto es mucho más evidente en el último caso. Estos resultados sugieren que, de manera parecida al cierre de las heridas epiteliales (Bass et al., 2011), se depositará una ECM rica en fibronectina por la que migrarán los distintos tipos celulares gracias a la unión fibronectina- *itg α 5*.

También hemos identificado *periostin* en el microarray. Periostin es una proteína que se secreta a la ECM donde se une a otras proteínas y a receptores celulares (Snider et al., 2009). Hemos observado en el microarray que la expresión de *periostin* disminuye a 12 y 24 hpa tanto en aletas como en corazón para después aumentar en los dos siguientes tiempos analizados. En trabajos parecidos al nuestro, se ha visto que aumenta su transcripción durante la regeneración de la aleta y el corazón en pez cebra (Padhi et al., 2004; Sleep et al., 2010). Teniendo en cuenta que durante el cierre de heridas cutáneas se requiere para proliferación de queratinocitos y la re-epitelización (Nishiyama et al.), podemos sugerir que durante la regeneración de la aleta intervenga y sea esencial en estos mismos procesos. En el caso de la regeneración del corazón se sabe que *periostin* no se expresa en cardiomiocitos (Snider et al., 2009). Periostin también es fundamental en la respuesta tras un infarto agudo y que se requiere en el reclutamiento de fibroblastos activados que van a ayudar en la reparación de la lesión (Shimazaki et al., 2008). Nosotros no hemos observado tampoco expresión de

periostin en los cardiomiocitos. Nuestros datos junto con los anteriores (Shimazaki et al., 2008), sugieren que *periostin* puede participar en el reclutamiento de fibroblastos durante la regeneración del corazón. No se ha demostrado la intervención de fibroblastos en la regeneración del corazón en el modelo de amputación, pero podrían jugar un papel importante. Hacen falta más experimentos para saber si los fibroblastos participan en la regeneración del corazón en el modelo de amputación (se ha visto que sí que intervienen en el modelo de criolesión (Chablais et al., 2011; Gonzalez-Rosa et al., 2011)) y cuál es su papel.

Otro de los genes relacionados con la ECM que hemos validado es *ctgf*. Hemos validado el aumento de expresión de *ctgf* en la regeneración mediante qPCR e ISH. Ctgf es una proteína secretada que está implicada entre otras cosas en angiogénesis, diferenciación, reparación de heridas y fibrosis (Daniels et al., 2009). En un trabajo parecido al nuestro, se ha observado que su transcripción aumentaba durante la regeneración del corazón (Lien et al., 2006) USA. lien@enders.tch.harvard.edu/auth-addr. Nosotros hemos demostrado que *ctgf* se expresa a partir de 12 hpa en aletas y corazones en regeneración mediante ISH. Su falta de función da lugar a fallos en angiogénesis, remodelación de la ECM y en la formación de hueso (Daniels et al., 2009). Todo esto sugiere que *ctgf* intervenga en uno o varios de estos procesos durante la regeneración de la aleta. Harían falta experimentos de pérdida de función para poder dilucidar cuál es su papel durante el proceso. En el caso de la regeneración del corazón se sabe que tras daño cardiaco en mamíferos *ctgf* se expresa en cardiomiocitos y miofibroblastos en el área isquémica y en los fibroblastos y el endotelio del área no dañada (Daniels et al., 2009). Se ha visto en un modelo transgénico murino de sobreexpresión cardiaca de *ctgf* que tras infarto se mejora la respuesta y la lesión es menor. Esto no parece que sea debido a una mayor deposición de ECM (en torno a un 30-40% mayor), si no a un cambio en la señalización celular y en la expresión de genes con propiedades cardioprotectoras (Ahmed et al.). Todo esto sugiere que Ctgf puede tener

un papel similar durante la regeneración del corazón, y que sea una de las señales encargadas de disparar la regeneración del corazón en el pez cebra.

El último de los genes relacionado con la ECM que hemos identificado en el microarray y hemos validado por qPCR e ISH sus cambios de transcripción, es *keratina 18*. En un trabajo sobre la regeneración de la aleta se había mostrado que la transcripción de *keratina 18* aumentaba durante el proceso (Padhi et al., 2004). Durante la regeneración cardíaca, se expresa a partir de 1dpa por todo el epicardio así como en el endocardio de la herida. El patrón de expresión en el epicardio es muy similar al descrito para otros genes como *radh2* o *tbx18* (Kikuchi et al., 2011b; Lepilina et al., 2006). Esto sugiere que la activación sistémica del epicardio dispara también la expresión de *keratina 18*. Es probable que *keratina 18* se requiera en la formación de filamentos intermedios (los forma junto con *keratina 8* que también estaba aumentada en el microarray) y que éstos sean necesarios para la re-epitelialización y migración de la epidermis durante la regeneración de la aleta. Durante la regeneración del corazón podría intervenir en la migración y proliferación del epicardio para cubrir el miocardio expuesto.

2.2 Genes implicados en señalización intracelular: *junB* y *hyou1*.

Otros genes que hemos identificado en el microarray y cuya implicación en la regeneración de la aleta se ha descrito posteriormente, han sido *junB* y *junB-like* (Ishida et al., 2010). *junB* se expresa tanto en la aleta como en el corazón durante la regeneración. En la aleta, se sabe que no se requiere en el cierre de la herida, pero sí en la formación del blastema (Ishida et al., 2010). Nosotros hemos visto que durante la regeneración del corazón su expresión está confinada a la zona más externa de la herida. Inicialmente, al endocardio a 1dpa y a 3dpa, se expresa también en el epicardio. A partir de 7 dpa sólo se expresa en la zona más externa de la zona de amputación. Este patrón es similar al

que muestra durante la regeneración de la aleta, en la que en un primer momento su activación se produce en el epitelio, para posteriormente pasar al blastema, donde se requiere para la proliferación (Ishida et al., 2010). El patrón de expresión a 7 dpa es parecido al de *gata4* un poco después (Kikuchi et al., 2010). Esto sugiere que durante la regeneración del corazón, *junb* se requiera para la proliferación de los cardiomiocitos.

En este trabajo también hemos identificado y demostrado la participación de la chaperona Hyoy1 o ORF150. Hemos visto que se expresa durante la regeneración del aleta y del corazón. Esta proteína se ha implicado en protección frente a hipoxia en varios sistemas (Ozawa et al., 1999; Tamatani et al., 2001), por lo que puede actuar de manera parecida durante la regeneración de la aleta y del corazón, ya que aquí también se genera hipoxia por la falta de riego sanguíneo. Asimismo se sabe que durante el cierre y la reparación de heridas Hyoy1 está implicada en neovascularización y que su administración exógena acelera el proceso (Ozawa et al., 2001). Cabe sugerir que durante la regeneración de la aleta participe de la misma forma. Sin embargo, durante la regeneración del corazón podría tener otro papel, ya que Hyo1 participa en la respuesta al daño cardíaco inhibiendo la apoptosis y preservando la función contráctil (Aleshin et al., 2005). Este podría ser el caso, puesto que *hyoy1* se expresa únicamente en la zona dañada durante la regeneración del corazón en el pez cebra.

3. VALIDACIÓN POR qPCR Y POR ISH DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN CARDÍACA: *PESCADILLO*.

En el transcurso de esta tesis analizamos el perfil de transcripción durante la regeneración del corazón, e identificamos genes que no habíamos obtenido en el análisis conjunto. Entre estos genes, el que más nos llamó la atención fue *pescadillo* ya que juega un importante papel en el desarrollo y regula la

proliferación e inhibe la apoptosis (Gessert et al., 2007). Por ello validamos el resultado por qPCR e ISH. Observamos su expresión a las 12 hpa mediante qPCR y a 1 dpa mediante ISH. A partir de 3 dpa decae su expresión, aunque se mantiene hasta al menos 14 dpa. Pescadillo es una proteína nuclear. Se ha visto que induce la apertura o despliegue de la cromatina, la transformación celular *in vitro*, la proliferación, la biogénesis de ribosomas, el ensamblaje de la envoltura nuclear y además durante el desarrollo se requiere en la formación y la migración de la cresta neural (Gessert et al., 2007; Lerch-Gaggl et al., 2002; Maiorana et al., 2004; Sikorski et al., 2006). El patrón y la dinámica de expresión de *pescadillo* sugieren que durante la regeneración del corazón podría participar en la apertura de la cromatina en las células de la herida. Estas células son las que van a de-diferenciarse y esta de-diferenciación se caracteriza por la expresión de genes propios del desarrollo cardíaco temprano.

4. VALIDACIÓN POR qPCR Y POR ISH DE GENES ESPECÍFICOS DE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA: *SALL1*, *SOX11A* Y *SOX11B*.

Hemos analizado el transcriptoma de la regeneración de la aleta y hemos validado alguno de los genes que previamente no habíamos identificado en el análisis conjunto. Estos genes son *sall1*, *sox11a* y *sox11b*.

Sall1, es un factor de transcripción implicado en la morfogénesis de la extremidad, en angiogénesis y en la diferenciación de células madre (Farrell and Munsterberg, 2000; Karantzali et al.; Kawakami et al., 2009; Sato et al., 2004; Yamamoto et al.). Además, *sall4*, uno de los genes de esta familia, está implicado en la formación y desarrollo de la aleta pectoral en el pez cebra (Harvey and Logan, 2006). Esto, junto con el hecho de que su expresión durante la regeneración de la aleta está confinada al blastema, nos sugiere que *sall1* se requiere

para la morfogénesis de la aleta durante la regeneración.

Al igual que *Sall1*, *Sox11a* y *sox11b* son factores de transcripción (Rimini et al., 1999) y ambos se expresan durante la regeneración de la aleta. Están implicados en regeneración de la espina dorsal en pez cebra (Guo et al.), y en mantenimiento de la identidad de progenitores neurales en el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico (Jankowski et al., 2006; Lin et al.), así como en regeneración en mamíferos (Jankowski et al., 2009). Esto sugiere que *sox11a* y *sox11b* durante la regeneración de la aleta podrían estar implicados en la regeneración de las células neurales que se encuentran en la aleta.

5. VALIDACIÓN FUNCIONAL DE GENES EXPRESADOS DURANTE LA REGENERACIÓN DE LA ALETA Y DEL CORAZÓN: *CAVEOLINA-1*, *PTRF-CAVIN*, *RALDH2*, *MIDKINE-A* Y *SYNDECAN-2*.

5.1 Caveolina-1 y PTRF-cavin en la regeneración de la aleta.

Caveolina 1 es la proteína responsable de la formación y función de las caveolas que, participan y regulan multitud de funciones celulares (Chidlow and Sessa, 2010). *Caveolina 1* se expresa durante la regeneración de la aleta y del corazón. En condiciones normales, *cav-1* se expresa en el extremo de la aleta caudal del pez cebra. Esto puede explicar porqué en el resultado de nuestros microarrays la expresión de *cav-1* es menor que en los controles. Sin embargo, tanto por PCR cuantitativa como por ISH hemos visto que se induce su expresión en el proceso y que está restringida a la zona del blastema. Todo ello sugiere que además de estar involucrada en la regeneración de la aleta lo está también en la homeostasis, de manera parecida a lo que ocurre en el caso de los FGFs (Wills et al., 2008b).

También hemos visto que durante la regeneración de la aleta se induce la expresión de PTRF-cavin, una proteína implicada en la formación y función de las caveolas (Hill et al., 2008). Además el patrón de expresión de *PTRF-cavin* solapa con el de *cav1*. La inyección de un MO contra *cav1* o contra *PTRF-cavin* en aletas en regeneración afecta el proceso. Esta inhibición es en parte debida a una menor tasa de proliferación, tal y como indican los ensayos de incorporación de BrdU. Estos datos sugieren que la formación de caveolas juega un papel fundamental en la regeneración de la aleta y posiblemente del corazón.

Para estudiar más en detalle la relevancia funcional de *cav1* durante la regeneración, hemos generado un transgénico inducible de falta de función. Observamos que al inducir la expresión del dominante negativo durante el desarrollo obtenemos un fenotipo muy similar al que se obtiene tras la inyección de un MO contra *cav1* (Hill et al., 2008; Nixon et al., 2007). Sin embargo, estos transgénicos una vez alcanzada la edad adulta, no expresan el transgén en la aleta, posiblemente debido a un fenómeno de silenciamiento génico.

5.2 Caveolina-1 y PTRF-cavin en la regeneración del corazón.

Durante la regeneración del corazón *cav-1* se expresa en el epicardio a partir de 12 hpa donde vemos su expresión por ISH a 1dpa y hasta al menos 14 dpa. El patrón de expresión de *cav-1* durante la regeneración del corazón es muy similar al que obtuvimos para *PTRF-cavin*. *PTRF-cavin* se expresa por todo el epicardio desde 1 dpa y hasta 14dpa. Ambos se expresan también durante la regeneración del corazón en el modelo de crio-infarto (datos no mostrados). En los animales transgénicos que hemos generado y donde sobre-expresamos la versión dominante negativa de *cav-1* tras choque térmico, hemos observado en experimentos de regeneración del corazón tras crio-infarto que son incapaces de regenerar correctamente la lesión. Estos resultados sugieren que durante

la regeneración del corazón la formación de caveolas va a tener un papel fundamental.

Un posible mecanismo de acción de Cav-1 en la regeneración de la aleta y el corazón, al menos en la zona de la herida, sería el reciclaje de los receptores Itg α 5, como se ha visto que ocurre en el proceso de cierre de heridas (Bass et al., 2011). En los ratones deficientes para *caveolina*, el cierre de las heridas está retrasado, y se atribuye a un defecto en la migración de fibroblastos (Grande-Garcia et al., 2007). Las caveolas formadas por Cav-1 y PTRF-cavin, retiran de la membrana los receptores itg α 5 permitiendo así la migración de los fibroblastos. Pasado un tiempo, se relocizará itg α 5 en la membrana, para así establecer nuevas contactos con la ECM (Bass et al., 2011). Todo este proceso es iniciado por Syndecan-4, que funciona como un regulador de Itg α 5, e induce su internalización en caveolas (Bass et al., 2011).

5.3 Raldh2 en la regeneración de la aleta.

Hemos observado en el microarray y corroborado por ISH, que *raldh2* se expresa durante la regeneración de la aleta y del corazón. En el caso de la aleta, se expresa a partir de 12 hpa en la zona donde posteriormente se formará el blastema. Durante la regeneración del corazón se expresa a partir de 1 dpa en el endocardio la zona amputada y por todo el epicardio. Además, se induce su expresión también en el modelo de crio-infarto, a 1dpi en el endocardio de la zona infartada y por todo el epicardio.

Raldh2 está implicado en la producción de ácido retinoico, un importante regulador transcripcional a través de la unión nuclear a receptores de hormonas (revisado en (Duester, 2008), y recientemente se ha demostrado su implicación en la regeneración del corazón (Kikuchi et al., 2011b), de la aleta (Blum and Begemann, 2012) y del primordio de la aleta en larvas de pez cebra (Kikuchi et al., 2011b; Mathew et al., 2009). Nosotros hemos demostrado su requerimiento durante la regeneración de la

aleta en adultos. La inhibición de *raldh2* bien mediante el uso de inhibidores farmacológicos o mediante la inyección de un MO bloquea el proceso regenerativo. La inhibición temprana de *raldh2* bloquea la regeneración y afecta al cierre de la herida y al establecimiento del blastema. El aspecto “aserrado” de la aleta resultante de la inhibición de *raldh2* durante varios días, es muy similar al que muestra al ser inhibida la vía de activina (Jazwinska et al., 2007). Si inhibimos el proceso mediante la microinyección de un MO una vez establecido el blastema, también lo afectamos. Además, la inhibición farmacológica de RA a baja dosis, aunque permite que se forme el epitelio de la herida y se especifique el blastema, también afecta al proceso regenerativo. Las aletas regeneran menos y su aspecto general es más desestructurado. Este último resultado junto con inhibición mediante MO, nos indica que *raldh2* también juega un papel clave durante la última fase de la regeneración de la aleta: el crecimiento regenerativo. En esta fase, podría estar implicado en la diferenciación de los osteocitos durante la formación del hueso, como se ha descrito en el caso de la regeneración de la extremidad de otros vertebrados (Duester, 2008).

5.4 Raldh2 en la regeneración del corazón.

Durante la regeneración del corazón hemos observado que los niveles de transcripción de *raldh2* estaban muy aumentados a partir de 12 hpa. Esto ocurre tanto en el caso del modelo de regeneración tras amputación como en el de crioinfarto. En ambos modelos, *raldh2* se expresa tanto en el epicardio como en el endocardio y los patrones de expresión a lo largo del tiempo son muy similares y coinciden con el patrón recientemente descrito (Kikuchi et al., 2011b). Se sabe que la señalización por RA es necesaria para la proliferación de los cardiomiocitos (Kikuchi et al., 2011b). Además, nosotros hemos observado gracias a su inhibición farmacológica, que se requiere durante la respuesta inflamatoria para el reclutamiento de macrófagos a la zona de la herida. De la misma manera hemos visto

su inhibición afecta a la expresión de otros genes implicados en la regeneración (*mdka*) lo que sugiere que la señalización por RA juega un papel importante en la regulación génica durante la regeneración.

5.5 Mdka y syndecan-2 en la regeneración de la aleta.

El último de los genes que hemos identificado y validado ha sido *mdka*. Este se expresa a partir de 12 hpa en aletas y en corazones en regeneración. Durante la regeneración de la aleta, *mdka* se expresa a 12 hpa en la zona que va a dar lugar al blastema y en el bolsillo interradyal. Posteriormente se expresa en el blastema a 1 dpa para quedar finalmente su expresión confinada al blastema distal a 3 dpa. Este patrón de expresión es muy similar al que hemos mostrado para *raldh2*. Además, hemos observado que durante la regeneración de la aleta, se expresan también varios receptores de *mdka*. Estos receptores son LRP2, Syndecan-2, Syndecan-3 y Syndecan-4. El patrón de expresión de todos ellos es, de nuevo, muy parecido al de *mdka*. *Mdka* y Syndecan2 se requieren durante la regeneración de la aleta y su inhibición mediante la inyección de un MO afecta a la regeneración y disminuye la proliferación.

Hemos generado dos líneas transgénicas para generar fenotipos de falta de función de *mdka*, en las que inducimos la expresión de un dominante negativo de *mdka* o del dominio de unión a midkine del receptor LRP1. La inducción de uno u otro transgén durante el desarrollo embrionario produce un fenotipo a 2 dpf muy similar al de la inyección del mRNA del dominante negativo (Winkler and Moon, 2001). Hemos probado estas líneas durante la regeneración de la aleta, y al menos una de ellas (la *(hsp70:mdk-DN)* inhibe parcialmente la regeneración de la aleta. Esta inhibición tiene lugar en alrededor del 50% de los individuos, y se caracteriza por afectar al cierre de la herida y a la formación del blastema. La aleta muestra un aspecto aserrado debido posiblemente a que

se ha bloqueado la formación de la epidermis de la herida. Este aspecto es muy similar al que observamos cuando inhibimos la señalización por RA o activina (Jazwinska et al., 2007). Sin embargo, en esta misma línea, los radios de algunos de los peces sí que forman la epidermis y un primordio de blastema lo que indica que o bien que la expresión de la versión dominante negativa no es lo bastante potente como para inhibir por completo la señalización por *Mdka* endógeno o bien que existe otra señal distinta que es capaz de compensar la falta de función de esta. La sobreexpresión de la versión WT en los transgénicos de ganancia de función no parecen afectar a la regeneración. En contra de lo que esperábamos no hemos observado un incremento en la tasa de proliferación ni tampoco una aceleración significativa del proceso regenerativo en estos transgénicos.

Todo esto sugiere que, al igual que *raldh2*, *mdka* interviene en todas las fases de la regeneración de la aleta.

5.6 *Mdka* y syndecan-2 durante la regeneración del corazón.

Durante la regeneración del corazón *mdka* se expresa a partir de 12 hpa en el epicardio que rodea a las cámaras. Posteriormente a 7 dpa, su expresión queda restringida al epicardio de la zona dañada. A 7 dpa y más adelante, se expresa en el miocardio de la zona dañada pero nunca solapa con *cmlc2*, que marca la no dañada o regenerada. De los varios genes de receptores de *mdka* analizados, únicamente *syndecan-2* y *syndecan-4* se expresan durante la regeneración del corazón. Sus patrones de expresión son muy similares a los de *mdka*, lo que sugiere que *mdka* podría actuar a través de ellos. La inducción de la expresión de un dominante negativo de *mdk* (*hsp70:mdk-DN*) durante la regeneración, bloquea el proceso regenerativo. A 30 dpa, observamos una zona de miocardio que se corresponde con la zona donde se produjo la amputación, y que no expresa el marcador de madurez *cmlc2*. El mismo resultado se ha visto en peces transgénicos donde se inhibe la

señalización a través de FGFs (Lepilina et al., 2006).

Mdka también se expresa durante la regeneración del corazón después de un crioinfarto. Se expresa por todo el epicardio desde 12 hpi y hasta 1 dpi, y se restringe a la zona infartada a 3dpi. En este momento se observa su expresión tanto en el epicardio como en el endocardio más próximo al área lesionada, justo en el borde entre la zona sana y la infartada. A 7dpi, se expresa en la parte más externa parte del miocardio dañado. *mdka*, al igual que *raldh2*, se expresa a 12 y 24 hpi por todo el epicardio. Sin embargo mientras que *raldh2* va a expresarse también en el endocardio de la zona sana más próxima a la zona infartada, *mdka* permanece en el epicardio y parte de la zona del miocardio dañado. La inhibición de la señalización de *mdka* durante la regeneración de un crioinfarto en las dos líneas transgénicas generadas (*hsp70:mdk-DN* y *hsp70:mdk-TRAP*) bloquea el proceso. Mientras que los corazones de los animales control han regenerado y expresan el marcador *cmlc2* por todo el miocardio, los de los transgénicos presentan una gran zona que no lo expresa. En su lugar hemos encontrado una cicatriz formada en su mayor parte por colágeno (y algo de fibrina). En parte este defecto puede ser explicado por el hecho de que el índice de proliferación de los cardiomiocitos en estas mismas líneas disminuye en un 50% al inhibir la señalización a través de *Mdk*. No sabemos si *Mdka* promueve de manera directamente la proliferación o si es un efecto secundario. Sin embargo parece poco probable que la inhibición de la proliferación sea la única explicación ya que se ha visto en modelos murinos de falta y ganancia de función que *Mdk* promueve la angiogénesis, inhibe la apoptosis y promueve al proceso de remodelación de fibrosis (Horiba et al., 2006; Sumida et al., 2010; Takenaka et al., 2009).

Además, la sobreexpresión de un dominante negativo de *syndecan-2*, uno de los posibles receptores de *mdka*, también inhibe el proceso y produce un fenotipo muy parecido al de la inhibición de *mdka*: una gran zona del corazón donde no se expresa *cmlc2*. Al igual

que en el caso anterior de nuevo encontramos una gran cicatriz formada por colágeno y fibrina. Los resultados que mostramos con el transgénico de falta de función de *syndecan* (*hsp70: synd-DN*) no podemos atribuirlos únicamente a su papel como receptor de *mdka* (véase más adelante). Puede que Syndecan-4 y/o Syndecan-2 únicamente actúen como receptores de *Mdka*, o que sólo lo hagan como reguladores de la disponibilidad de *Itga5*, o que estén involucrados en ambas funciones. Todo hace pensar que sea este último el caso ya que en estudios de respuesta a infarto cardiaco llevados a cabo en ratones deficientes en *Synd4* (Matsui et al.) los resultados obtenidos muestran grandes semejanzas tanto con los obtenidos con *Mdk* como con *Itga5*. Los ratones deficientes en *Synd4* muestran una mayor mortalidad, una menor respuesta inflamatoria y una incorrecta formación del tejido granulado tras el infarto (Matsui et al.). Todo esto casa con los resultados obtenidos en ratones deficientes en *Mdk* (Horiba et al., 2006; Sumida et al., 2010; Takenaka et al., 2009), lo que sugiere que sirve como el receptor de midkine tras infarto. Además, se ha observado que el tratamiento de los animales infartados con *mdk* exógeno mejora la reparación del tejido infartado (Sumida et al., 2010; Takenaka et al., 2009) y aumentan los niveles de transcripción de *synd1*, *synd3* y *synd4* (Takenaka et al., 2009). Por otro lado, en ratones deficientes en *syn4* se ha visto que la migración, la señalización inducida por Fibronectina y la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos es defectiva (Matsui et al.). Estos resultados sugieren que también durante la regeneración cardiaca *Synd* va a regular la migración y diferenciación de fibroblastos a través de la regulación de la disponibilidad de receptores de *Itga5*.

6. RELACIÓN ENTRE WT1, RALDH2 Y MDKA EN LA REGENERACIÓN DEL CORAZÓN.

Mdka se identificó por primera vez como un gen de respuesta a RA (Tsutsui et

al., 1991). A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK y desde entonces se ha visto que su expresión es inducida por RA en gran variedad de sistemas y modelos y que existe un elemento de respuesta a RA en su promotor (Matsubara et al., 1994; Muramatsu, 2002). También se ha descrito la presencia de un elemento de unión de *Wt1* en el promotor de *mdka*, lo que sugiere que la transcripción de *mdka* sea regulada también por *Wt1* (Adachi et al., 1996). Como ya se ha dicho anteriormente tanto *Raldh2* como *Wt1* están implicados en el desarrollo del corazón y juegan un papel importante en el desarrollo del epicardio (Duester, 2008; Lin et al., 2010; Niederreither et al., 2001; Wagner et al., 2003). Recientemente se ha descrito que *Wt1* controla la señalización de RA a través de la activación de la transcripción de *raldh2* (Guadix et al., 2011). Nosotros hemos generado una línea transgénica donde podemos inducir la expresión de un dominante negativo de *Wt1* y hemos observado que su expresión durante la regeneración del corazón bloquea el proceso. Los corazones de los animales transgénicos no son capaces de regenerar el músculo de la zona infartada y en su lugar aparece queda una cicatriz formada principalmente por colágeno. Sabiendo que *wt1*, al igual que *raldh2* y *mdka*, se expresa en el epicardio durante la regeneración del corazón cabe sugerir que *Wt1* podría estar regulando la expresión de ambos.

En el caso de *raldh2*, creemos que la expresión de *wt1* en el epicardio estaría manteniendo la expresión de *raldh2* que previamente se habría activado en respuesta a otra señal por determinar. Creemos que podría ser así porque *raldh2* es uno de los genes cuya expresión más rápidamente se induce tras diferentes tipos de daños provocados en el corazón (Kikuchi et al., 2011b), mientras que *wt1* lo hace algo más tarde (Gonzalez-Rosa et al., 2011; Schnabel et al., 2011). Además *raldh2* se induce por todo el epicardio y el endocardio del corazón, mientras que *wt1* sólo se induce en el epicardio (Gonzalez-Rosa et al., 2011; Kikuchi et al., 2011b; Schnabel et al., 2011). Pensamos que la expresión algo más tardía de *Wt1* mantendría los niveles de expresión de

raldh2 elevados en el epicardio. Esto podría explicar en parte el hecho de la expresión de *raldh2* desaparezca a las pocas horas en el endocardio, a excepción de la zona de la herida. Aquí debe existir otra señal que mantenga la expresión de *raldh2*.

En el caso de *mdka*, hemos mostrado que la inhibición de la señalización a través de RA disminuye de manera notable su expresión en el epicardio a 1 dpa. Además la infiltración de macrófagos también es menor en animales en los que se ha inhibido la vía de RA, y este mismo efecto se observa en peces transgénicos en los que se ha inducido la expresión del dominante negativo de *mdka*. Todo esto sugiere que *raldh2* induce la expresión de *mdka* en el epicardio, y que ambos se requieren para la señalización e infiltración de macrófagos en el tejido dañado. La expresión remanente de *mdka* que observamos al inhibir RA puede ser debida a la unión directa de Wt1 sobre su promotor y su inducción. Habría que determinar qué ocurre en la línea transgénica de pérdida de función de Wt1 (*hsp70: wt1-DN*) con la expresión de *raldh2* y *mdka*, así como con la infiltración de macrófagos.

En ratones y ratas se ha demostrado que la expresión de *mdka* se induce tras un infarto de miocardio (Horiba et al., 2006; Sumida et al., 2010; Takenaka et al., 2009). También se ha demostrado que el tamaño del área infartada es mayor en ratones deficientes para *mdka* y que el porcentaje de supervivencia tras 20 días es tres veces menor en ratones mutantes (Horiba et al., 2006; Takenaka et al., 2009). Por otro lado, la administración exógena de Mdk mejora la respuesta al infarto dando lugar a un corazón funcionalmente más similar al pre-operado y aumentando el número de animales supervivientes a los 20 días (Sumida et al., 2010; Takenaka et al., 2009). Los mecanismos celulares sobre los que actúa Mdk son la inhibición de la muerte celular y de la fibrosis, y la promoción de la angiogénesis (Horiba et al., 2006; Sumida et al., 2010; Takenaka et al., 2009). Nosotros no hemos analizado que ocurre con la apoptosis y la angiogénesis en nuestros modelos transgénicos de pérdida de función, pero todo

apunta a que estarán afectadas y que *mdka* podría estar actuando de una manera similar durante la regeneración del corazón en el pez cebra. Sin embargo hemos observado que la proliferación de los cardiomicitos en nuestro transgénicos de falta de función de Mdk esta afectada y que el índice de proliferación disminuye en los dos modelos de daño cardiaco.

Es de esperar también que *wt1*, *raldh2* y *mdka* estén implicados igualmente en la TEM del epicardio para dar células perivasculares que contribuyan a la formación de capilares que irrigen la zona dañada.

CONCLUSIONES

1. La regeneración del corazón y de la aleta en el pez cebra comparten un programa común de expresión génica a pesar de las diferencias entre los dos órganos. Los dos procesos regenerativos comparten una serie de genes con un perfil similar de expresión en ambos procesos, lo que sugiere que llevan a cabo funciones parecidas. Existe también, sin embargo, genes con un perfil de expresión complementario, lo que sugiere que pueden llevar a cabo funciones antagónicas.
2. A pesar de este programa de expresión génica común, existen una gran cantidad de genes que son específicos de cada proceso., Entre los genes que se comportan de manera similar, muchos de ellos están relacionados con la matriz extracelular, su regulación y su remodelación, otros son genes de respuesta a estrés y plegamiento de proteínas, lo que sugiere una gran importancia de estos fenómenos durante ambos procesos.
3. Durante la regeneración de la aleta y del corazón aumenta la expresión de Raldh2, cuya función es requerida en todas las fases de la regeneración de la aleta: cierre de la herida, formación del blastema y crecimiento regenerativo.
4. Durante la regeneración de la aleta y del corazón aumenta la expresión de caveolina-1 y de PTRF-cavina. Ambos son necesarios para la proliferación durante la regeneración de la aleta, y al menos caveolina-1, se requiere para la regeneración del corazón. Estos resultados sugieren que la formación de caveolas va a tener un papel fundamental en ambos procesos.
5. Durante la regeneración de la aleta y del corazón aumenta la expresión del ligando midkine-a, así como la de varios de sus receptores, entre ellos syndecan-2. Ambos son necesarios para la proliferación durante la regeneración de la aleta, y al menos mdka se requiere para el establecimiento del blastema.
6. Wt1, midkine-a y syndecan-2 son necesarios para que la regeneración del corazón tenga lugar. Al menos Wt-1 y Midkine-a se requieren para la proliferación de los cardiomiocitos durante el proceso.
7. La expresión de midkine-a está regulada en parte por raldh2 y posiblemente también por Wt1, tal y como sugieren estudios preeliminares. Tanto raldh2 como midkine-a están implicados en la infiltración de macrófagos durante la regeneración lo que sugiere que van a participan en la regulación de la inflamación.

BIBLIOGRAFÍA

- Ablooglu, A.J., Tkachenko, E., Kang, J., and Shattil, S.J. (2010). Integrin α V is necessary for gastrulation movements that regulate vertebrate body asymmetry. *Development* 137, 3449-3458.
- Adachi, Y., Matsubara, S., Pedraza, C., Ozawa, M., Tsutsui, J., Takamatsu, H., Noguchi, H., Akiyama, T., and Muramatsu, T. (1996). Midkine as a novel target gene for the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene* 13, 2197-2203.
- Ahmed, M.S., Gravning, J., Martinov, V.N., von Lueder, T.G., Edvardsen, T., Czibik, G., Moe, I.T., Vinge, L.E., Oie, E., Valen, G., *et al.* Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H1291-1302.
- Akimenko, M.A., Johnson, S.L., Westerfield, M., and Ekker, M. (1995). Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development* 121, 347-357.
- Akimenko, M.A., Mari-Beffa, M., Becerra, J., and Geraudie, J. (2003). Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn* 226, 190-201.
- Aleshin, A.N., Sawa, Y., Kitagawa-Sakakida, S., Bando, Y., Ono, M., Memon, I.A., Tohyama, M., Ogawa, S., and Matsuda, H. (2005). 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 517-525.
- Allende, M.L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N., and Hopkins, N. (1996). Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, *pescadillo* and *dead eye*, essential for embryonic development. *Genes Dev* 10, 3141-3155.
- Arrington, C.B., and Yost, H.J. (2009). Extra-embryonic syndecan 2 regulates organ primordia migration and fibrillogenesis throughout the zebrafish embryo. *Development* 136, 3143-3152.
- Azambuja, A.P., Portillo-Sanchez, V., Rodrigues, M.V., Omae, S.V., Schechtman, D., Strauss, B.E., Costanzi-Strauss, E., Krieger, J.E., Perez-Pomares, J.M., and Xavier-Neto, J. Retinoic acid and VEGF delay smooth muscle relative to endothelial differentiation to coordinate inner and outer coronary vessel wall morphogenesis. *Circ Res* 107, 204-216.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16, 585-601.
- Bass, M.D., Williamson, R.C., Nunan, R.D., Humphries, J.D., Byron, A., Morgan, M.R., Martin, P., and Humphries, M.J. (2011). A Syndecan-4 Hair Trigger Initiates Wound Healing through Caveolin- and RhoG-Regulated Integrin Endocytosis. *Dev Cell* 21, 681-693.
- Bayliss, P.E., Bellavance, K.L., Whitehead, G.G., Abrams, J.M., Aegerter, S., Robbins, H.S., Cowan, D.B., Keating, M.T., O'Reilly, T., Wood, J.M., *et al.* (2006). Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish. *Nat Chem Biol* 2, 265-273.
- Beck, C.W., Izpisua Belmonte, J.C., and Christen, B. (2009). Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Dev Dyn* 238, 1226-1248.
- Begemann, G., Schilling, T.F., Rauch, G.J., Geisler, R., and Ingham, P.W. (2001). The zebrafish *neckless* mutation reveals a requirement for *raldh2* in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128, 3081-3094.
- Blum, N., and Begemann, G. (2012). Retinoic acid signaling controls the formation, proliferation and survival of the blastema during adult zebrafish fin regeneration. *Development* 139, 107-116.
- Bouzaifour, M., Dufourcq, P., Lecaudey, V., Haas, P., and Vriza, S. (2009). Fgf and

Sdf-1 pathways interact during zebrafish fin regeneration. *PLoS One* 4, e5824.

Calinescu, A.A., Vihtelic, T.S., Hyde, D.R., and Hitchcock, P.F. (2009). Cellular expression of midkine-a and midkine-b during retinal development and photoreceptor regeneration in zebrafish. *J Comp Neurol* 514, 1-10.

Chablais, F., and Jazwinska, A. (2010). IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration. *Development* 137, 871-879.

Chablais, F., Veit, J., Rainer, G., and Jazwinska, A. (2011). The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol* 11, 21.

Chang, Y.W., Goff, L.A., Li, H., Kane-Goldsmith, N., Tzatzalos, E., Hart, R.P., Young, W., and Grumet, M. (2009). Rapid induction of genes associated with tissue protection and neural development in contused adult spinal cord after radial glial cell transplantation. *J Neurotrauma* 26, 979-993.

Chen, E., Hermanson, S., and Ekker, S.C. (2004). Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* 103, 1710-1719.

Chen, S., Bu, G., Takei, Y., Sakamoto, K., Ikematsu, S., Muramatsu, T., and Kadomatsu, K. (2007). Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci* 120, 4009-4015.

Chidlow, J.H., Jr., and Sessa, W.C. (2010). Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res* 86, 219-225.

Christensen, R.N., and Tassava, R.A. (2000). Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Dev Dyn* 217, 216-224.

Corcoran, J.P., and Ferretti, P. (1997). Keratin 8 and 18 expression in mesenchymal

progenitor cells of regenerating limbs is associated with cell proliferation and differentiation. *Dev Dyn* 210, 355-370.

Curado, S., and Stainier, D.Y. (2006). The HeArt of regeneration. *Cell* 127, 462-464.

Danen, E.H., and Yamada, K.M. (2001). Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* 189, 1-13.

Daniels, A., van Bilsen, M., Goldschmeding, R., van der Vusse, G.J., and van Nieuwenhoven, F.A. (2009). Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)* 195, 321-338.

de Celis, J.F., and Barrio, R. (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int J Dev Biol* 53, 1385-1398.

de Felipe, P., Luke, G.A., Hughes, L.E., Gani, D., Halpin, C., and Ryan, M.D. (2006). E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol* 24, 68-75.

de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., *et al.* (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124, 1139-1148.

de Martino, S., Yan, Y.L., Jowett, T., Postlethwait, J.H., Varga, Z.M., Ashworth, A., and Austin, C.A. (2000). Expression of sox11 gene duplicates in zebrafish suggests the reciprocal loss of ancestral gene expression patterns in development. *Dev Dyn* 217, 279-292.

del Monte, G., Casanova, J.C., Guadix, J.A., MacGrogan, D., Burch, J.B., Perez-Pomares, J.M., and de la Pompa, J.L. (2011). Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res* 108, 824-836.

Dobaczewski, M., Gonzalez-Quesada,

- C., and Frangogiannis, N.G. (2010). The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 48, 504-511.
- Draper, B.W., Morcos, P.A., and Kimmel, C.B. (2001). Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis* 30, 154-156.
- Duester, G. (2008). Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134, 921-931.
- Dufourcq, P., and Vríz, S. (2006). The chemokine SDF-1 regulates blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Dev Genes Evol* 216, 635-639.
- Eming, S.A., Hammerschmidt, M., Krieg, T., and Roers, A. (2009). Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 20, 517-527.
- Fang, P.K., Solomon, K.R., Zhuang, L., Qi, M., McKee, M., Freeman, M.R., and Yelick, P.C. (2006). Caveolin-1alpha and -1beta perform nonredundant roles in early vertebrate development. *Am J Pathol* 169, 2209-2222.
- Farrell, E.R., and Munsterberg, A.E. (2000). csal1 is controlled by a combination of FGF and Wnt signals in developing limb buds. *Dev Biol* 225, 447-458.
- Flynt, A.S., Li, N., Thatcher, E.J., Solnica-Krezel, L., and Patton, J.G. (2007). Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. *Nat Genet* 39, 259-263.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 123, 4195-4200.
- Garavito-Aguilar, Z.V., Riley, H.E., and Yelon, D. (2010). Hand2 ensures an appropriate environment for cardiac fusion by limiting Fibronectin function. *Development* 137, 3215-3220.
- Gargioli, C., and Slack, J.M. (2004). Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development* 131, 2669-2679.
- Geraudie, J., Monnot, M.J., Brulfert, A., and Ferretti, P. (1995). Caudal fin regeneration in wild type and long-fin mutant zebrafish is affected by retinoic acid. *Int J Dev Biol* 39, 373-381.
- Gessert, S., Maurus, D., Rossner, A., and Kuhl, M. (2007). Pescadillo is required for *Xenopus laevis* eye development and neural crest migration. *Dev Biol* 310, 99-112.
- Glickman, N.S., and Yelon, D. (2004). Coordinating morphogenesis: epithelial integrity during heart tube assembly. *Dev Cell* 6, 311-312.
- Gonzalez, M.I., Krizman-Genda, E., and Robinson, M.B. (2007). Caveolin-1 regulates the delivery and endocytosis of the glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1. *J Biol Chem* 282, 29855-29865.
- Gonzalez-Rosa, J.M., Martin, V., Peralta, M., Torres, M., and Mercader, N. (2011). Extensive scar formation and regression during heart regeneration after cryoinjury in zebrafish. *Development* 138, 1663-1674.
- Grande-Garcia, A., Echarri, A., de Rooij, J., Alderson, N.B., Waterman-Storer, C.M., Valdivielso, J.M., and del Pozo, M.A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J Cell Biol* 177, 683-694.
- Guadix, J.A., Ruiz-Villalba, A., Lettice, L., Velecela, V., Munoz-Chapuli, R., Hastie, N.D., Perez-Pomares, J.M., and Martinez-Estrada, O.M. (2011). Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development* 138, 1093-1097.
- Gulati, A.K., Zalewski, A.A., and Reddi, A.H. (1983). An immunofluorescent study of the distribution of fibronectin and laminin during limb regeneration in the adult newt. *Dev Biol* 96, 355-365.

- Guo, Y., Ma, L., Cristofanilli, M., Hart, R.P., Hao, A., and Schachner, M. Transcription factor Sox11b is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. *Neuroscience*.
- Han, Y., San-Marina, S., Yang, L., Khoury, H., and Minden, M.D. (2007). The zinc finger domain of Wilms' tumor 1 suppressor gene (WT1) behaves as a dominant negative, leading to abrogation of WT1 oncogenic potential in breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 9, R43.
- Harty, M., Neff, A.W., King, M.W., and Mescher, A.L. (2003). Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev Dyn* 226, 268-279.
- Harvey, S.A., and Logan, M.P. (2006). sall4 acts downstream of tbx5 and is required for pectoral fin outgrowth. *Development* 133, 1165-1173.
- Hill, M.M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S.J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V.M., Martin, S., *et al.* (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-124.
- Hinits, Y., and Hughes, S.M. (2007). Mef2s are required for thick filament formation in nascent muscle fibres. *Development* 134, 2511-2519.
- Hoptak-Solga, A.D., Nielsen, S., Jain, I., Thummel, R., Hyde, D.R., and Iovine, M.K. (2008). Connexin43 (GJA1) is required in the population of dividing cells during fin regeneration. *Dev Biol* 317, 541-548.
- Horiba, M., Kadomatsu, K., Yasui, K., Lee, J.K., Takenaka, H., Sumida, A., Kamiya, K., Chen, S., Sakuma, S., Muramatsu, T., *et al.* (2006). Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation* 114, 1713-1720.
- Hu, N., Yost, H.J., and Clark, E.B. (2001). Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *Anat Rec* 264, 1-12.
- Hutton, E., Paladini, R.D., Yu, Q.C., Yen, M., Coulombe, P.A., and Fuchs, E. (1998). Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. *J Cell Biol* 143, 487-499.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326, 1216-1219.
- Ichihara-Tanaka, K., Oohira, A., Rumsby, M., and Muramatsu, T. (2006). Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J Biol Chem* 281, 30857-30864.
- Ishida, T., Nakajima, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2010). Phosphorylation of Junb family proteins by the Jun N-terminal kinase supports tissue regeneration in zebrafish. *Dev Biol* 340, 468-479.
- Jankowski, M.P., Cornuet, P.K., McIlwrath, S., Koerber, H.R., and Albers, K.M. (2006). SRY-box containing gene 11 (Sox11) transcription factor is required for neuron survival and neurite growth. *Neuroscience* 143, 501-514.
- Jankowski, M.P., McIlwrath, S.L., Jing, X., Cornuet, P.K., Salerno, K.M., Koerber, H.R., and Albers, K.M. (2009). Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice. *Brain Res* 1256, 43-54.
- Jazwinska, A., Badakov, R., and Keating, M.T. (2007). Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Curr Biol* 17, 1390-1395.
- Jopling, C., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 79-89.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Marti, M.,

- Raya, A., and Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606-609.
- Julich, D., Geisler, R., and Holley, S.A. (2005). Integrin α 5 and delta/notch signaling have complementary spatiotemporal requirements during zebrafish somitogenesis. *Dev Cell* 8, 575-586.
- Julich, D., Mould, A.P., Koper, E., and Holley, S.A. (2009). Control of extracellular matrix assembly along tissue boundaries via Integrin and Eph/Ephrin signaling. *Development* 136, 2913-2921.
- Kanzler, B., Kuschert, S.J., Liu, Y.H., and Mallo, M. (1998). Hoxa-2 restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Development* 125, 2587-2597.
- Karantzali, E., Lekakis, V., Ioannou, M., Hadjimichael, C., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A. Sall1 regulates embryonic stem cell differentiation in association with Nanog. *J Biol Chem*.
- Kawakami, Y., Rodriguez Esteban, C., Raya, M., Kawakami, H., Marti, M., Dubova, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2006). Wnt/ beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev* 20, 3232-3237.
- Kawakami, Y., Uchiyama, Y., Rodriguez Esteban, C., Inenaga, T., Koyano-Nakagawa, N., Kawakami, H., Marti, M., Kmita, M., Monaghan-Nichols, P., Nishinakamura, R., *et al.* (2009). Sall genes regulate region-specific morphogenesis in the mouse limb by modulating Hox activities. *Development* 136, 585-594.
- Khatib, A.M., Lahlil, R., Scamuffa, N., Akimenko, M.A., Ernest, S., Lomri, A., Lalou, C., Seidah, N.G., Villoutreix, B.O., Calvo, F., *et al.* (2010). Zebrafish ProVEGF-C expression, proteolytic processing and inhibitory effect of unprocessed ProVEGF-C during fin regeneration. *PLoS One* 5, e11438.
- Kikuchi, K., Gupta, V., Wang, J., Holdway, J.E., Wills, A.A., Fang, Y., and Poss, K.D. (2011a). tcf21+ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development* 138, 2895-2902.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Major, R.J., Blum, N., Dahn, R.D., Begemann, G., and Poss, K.D. (2011b). Retinoic Acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Dev Cell* 20, 397-404.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Werdich, A.A., Anderson, R.M., Fang, Y., Egnaczyk, G.F., Evans, T., Macrae, C.A., Stainier, D.Y., and Poss, K.D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 464, 601-605.
- Killian, A., Le Meur, N., Sesboue, R., Bourguignon, J., Bougeard, G., Gautherot, J., Bastard, C., Frebourg, T., and Flaman, J.M. (2004). Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene* 23, 8597-8602.
- Kim, J., Wu, Q., Zhang, Y., Wiens, K.M., Huang, Y., Rubin, N., Shimada, H., Handin, R.I., Chao, M.Y., Tuan, T.L., *et al.* (2010). PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17206-17210.
- Kinoshita, Y., Jarell, A.D., Flaman, J.M., Foltz, G., Schuster, J., Sopher, B.L., Irvin, D.K., Kanning, K., Kornblum, H.I., Nelson, P.S., *et al.* (2001). Pescadillo, a novel cell cycle regulatory protein abnormally expressed in malignant cells. *J Biol Chem* 276, 6656-6665.
- Kizil, C., Otto, G.W., Geisler, R., Nusslein-Volhard, C., and Antos, C.L. (2009). Simplet controls cell proliferation and gene transcription during zebrafish caudal fin regeneration. *Dev Biol* 325, 329-340.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H. (2006). The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11,

441-450.

Knopf, F., Hammond, C., Chekuru, A., Kurth, T., Hans, S., Weber, C.W., Mahatma, G., Fisher, S., Brand, M., Schulte-Merker, S., *et al.* (2011). Bone Regenerates via Dedifferentiation of Osteoblasts in the Zebrafish Fin. *Dev Cell* 20, 713-724.

Koshida, S., Kishimoto, Y., Ustumi, H., Shimizu, T., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H., and Takada, S. (2005). Integrin $\alpha 5$ -dependent fibronectin accumulation for maintenance of somite boundaries in zebrafish embryos. *Dev Cell* 8, 587-598.

Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H.H., and Tanaka, E.M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature* 460, 60-65.

Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K., Inohaya, K., and Kudo, A. (2004). Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev Biol* 267, 473-487.

Kuhn, B., del Monte, F., Hajjar, R.J., Chang, Y.S., Lebeche, D., Arab, S., and Keating, M.T. (2007). Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 13, 962-969.

Kumar, A., Godwin, J.W., Gates, P.B., Garza-Garcia, A.A., and Brockes, J.P. (2007). Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 318, 772-777.

Kurosawa, N., Chen, G.Y., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sakuma, S., and Muramatsu, T. (2001). Glypican-2 binds to midkine: the role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconj J* 18, 499-507.

Laflamme, M.A., and Murry, C.E. (2011). Heart regeneration. *Nature* 473, 326-335.

Laforest, L., Brown, C.W., Poleo,

G., Geraudie, J., Tada, M., Ekker, M., and Akimenko, M.A. (1998). Involvement of the sonic hedgehog, patched 1 and bmp2 genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. *Development* 125, 4175-4184.

Latimer, A., and Jessen, J.R. (2010). Extracellular matrix assembly and organization during zebrafish gastrulation. *Matrix Biol* 29, 89-96.

Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M., and Poss, K.D. (2005). Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* 132, 5173-5183.

Lee, Y., Hami, D., De Val, S., Kagermeier-Schenk, B., Wills, A.A., Black, B.L., Weidinger, G., and Poss, K.D. (2009). Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. *Dev Biol* 331, 270-280.

Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G., and Poss, K.D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127, 607-619.

Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P., and Duncan, S.A. (2002). Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. *J Biol Chem* 277, 45347-45355.

Li, J., Yu, L., Zhang, H., Wu, J., Yuan, J., Li, X., and Li, M. (2009). Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cancer Sci* 100, 2255-2260.

Liedtke, D., and Winkler, C. (2008). Midkine-b regulates cell specification at the neural plate border in zebrafish. *Dev Dyn* 237, 62-74.

Lien, C.L., Schebesta, M., Makino, S., Weber, G.J., and Keating, M.T. (2006). Gene expression analysis of zebrafish heart regeneration. *PLoS Biol* 4, e260.

- Lin, L., Lee, V.M., Wang, Y., Lin, J.S., Sock, E., Wegner, M., and Lei, L. Sox11 regulates survival and axonal growth of embryonic sensory neurons. *Dev Dyn*.
- Lin, S.C., Dolle, P., Ryckebusch, L., Nosedá, M., Zaffran, S., Schneider, M.D., and Niederreither, K. (2010). Endogenous retinoic acid regulates cardiac progenitor differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 9234-9239.
- Luft, F.C. (2008). CCN2, the connective tissue growth factor. *J Mol Med* 86, 1-3.
- Maden, M. (1982). Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* 295, 672-675.
- Maden, M. (2002). Retinoic acid and limb regeneration--a personal view. *Int J Dev Biol* 46, 883-886.
- Maden, M. (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 8, 755-765.
- Maden, M., and Hind, M. (2003). Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Dev Dyn* 226, 237-244.
- Maeda, N., Ichihara-Tanaka, K., Kimura, T., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., and Noda, M. (1999). A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem* 274, 12474-12479.
- Maiorana, A., Tu, X., Cheng, G., and Baserga, R. (2004). Role of p53 in the transformation and immortalization of mammalian cells. *Oncogene* 23, 7116-7124.
- Martinez-Estrada, O.M., Lettice, L.A., Essafi, A., Guadix, J.A., Slight, J., Velecela, V., Hall, E., Reichmann, J., Devenney, P.S., Hohenstein, P., et al. Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* 42, 89-93.
- Mathew, L.K., Sengupta, S., Franzosa, J.A., Perry, J., La Du, J., Andreasen, E.A., and Tanguay, R.L. (2009). Comparative expression profiling reveals an essential role for raldh2 in epimorphic regeneration. *J Biol Chem* 284, 33642-33653.
- Matsubara, S., Take, M., Pedraza, C., and Muramatsu, T. (1994). Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. *J Biochem* 115, 1088-1096.
- Matsui, T., Raya, A., Callol-Massot, C., Kawakami, Y., Oishi, I., Rodríguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2007). miR-133-Mediated regulation of cell-fibronectin interaction and myocardial migration in zebrafish. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 Suppl 1, S77-82.
- Matsui, Y., Ikesue, M., Danzaki, K., Morimoto, J., Sato, M., Tanaka, S., Kojima, T., Tsutsui, H., and Ueda, T. Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after myocardial infarction. *Circ Res* 108, 1328-1339.
- McCurley, A.T., and Callard, G.V. (2010). Time Course Analysis of Gene Expression Patterns in Zebrafish Eye During Optic Nerve Regeneration. *J Exp Neurosci* 2010, 17-33.
- Meder, B., Just, S., Vogel, B., Rudloff, J., Gartner, L., Dahme, T., Huttner, I., Zankl, A., Katus, H.A., and Rottbauer, W. (2010). JunB-CBFbeta signaling is essential to maintain sarcomeric Z-disc structure and when defective leads to heart failure. *J Cell Sci* 123, 2613-2620.
- Mic, F.A., Haselbeck, R.J., Cuenca, A.E., and Duester, G. (2002). Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice. *Development* 129, 2271-2282.
- Mitsiadis, T.A., Salmivirta, M., Muramatsu, T., Muramatsu, H., Rauvala, H., Lehtonen, E., Jalkanen, M., and Thesleff, I.

- (1995). Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development* 121, 37-51.
- Mizuguchi, H., Xu, Z., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., and Hayakawa, T. (2000). IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 1, 376-382.
- Morris, A.C., Forbes-Osborne, M.A., Pillai, L.S., and Fadool, J.M. Microarray Analysis of XOPS-mCFP Zebrafish Retina Identifies Genes Associated with Rod Photoreceptor Degeneration and Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
- Moussad, E.E., and Brigstock, D.R. (2000). Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 71, 276-292.
- Muramatsu, H., Zou, K., Sakaguchi, N., Ikematsu, S., Sakuma, S., and Muramatsu, T. (2000). LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 936-941.
- Muramatsu, H., Zou, P., Suzuki, H., Oda, Y., Chen, G.Y., Sakaguchi, N., Sakuma, S., Maeda, N., Noda, M., Takada, Y., *et al.* (2004). alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J Cell Sci* 117, 5405-5415.
- Muramatsu, T. (2002). Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem* 132, 359-371.
- Muramatsu, T. (2010). Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86, 410-425.
- Nakanishi, T., Kadomatsu, K., Okamoto, T., Ichihara-Tanaka, K., Kojima, T., Saito, H., Tomoda, Y., and Muramatsu, T. (1997). Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem* 121, 197-205.
- Nechiporuk, A., and Keating, M.T. (2002). A proliferation gradient between proximal and msxb-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development* 129, 2607-2617.
- Nechiporuk, A., Poss, K.D., Johnson, S.L., and Keating, M.T. (2003). Positional cloning of a temperature-sensitive mutant emmental reveals a role for sly1 during cell proliferation in zebrafish fin regeneration. *Dev Biol* 258, 291-306.
- Ng, L.L., O'Brien, R.J., Quinn, P.A., Squire, I.B., and Davies, J.E. (2007). Oxygen-regulated protein 150 and prognosis following myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 112, 477-484.
- Niederreither, K., Vermot, J., Messaddeq, N., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Dolle, P. (2001). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 128, 1019-1031.
- Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., and Mitchison, T.J. (2009). A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996-999.
- Nishiyama, T., Kii, I., Kashima, T.G., Kikuchi, Y., Ohazama, A., Shimazaki, M., Fukayama, M., and Kudo, A. Delayed re-epithelialization in periostin-deficient mice during cutaneous wound healing. *PLoS One* 6, e18410.
- Nixon, S.J., Carter, A., Wegner, J., Ferguson, C., Floetenmeyer, M., Riches, J., Key, B., Westerfield, M., and Parton, R.G. (2007). Caveolin-1 is required for lateral line neuromast and notochord development. *J Cell Sci* 120, 2151-2161.
- Odelberg, S.J. (2005). Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New*

Anat 287, 25-35.

Ozawa, K., Kondo, T., Hori, O., Kitao, Y., Stern, D.M., Eisenmenger, W., Ogawa, S., and Ohshima, T. (2001). Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 108, 41-50.

Ozawa, K., Kuwabara, K., Tamatani, M., Takatsuji, K., Tsukamoto, Y., Kaneda, S., Yanagi, H., Stern, D.M., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., *et al.* (1999). 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem* 274, 6397-6404.

Padhi, B.K., Joly, L., Tellis, P., Smith, A., Nanjappa, P., Chevrette, M., Ekker, M., and Akimenko, M.A. (2004). Screen for genes differentially expressed during regeneration of the zebrafish caudal fin. *Dev Dyn* 231, 527-541.

Patel, H.H., Tsutsumi, Y.M., Head, B.P., Niesman, I.R., Jennings, M., Horikawa, Y., Huang, D., Moreno, A.L., Patel, P.M., Insel, P.A., *et al.* (2007). Mechanisms of cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for caveolae and caveolin-1. *Faseb J* 21, 1565-1574.

Perez-Pomares, J.M., Phelps, A., Sedmerova, M., Carmona, R., Gonzalez-Iriarte, M., Munoz-Chapuli, R., and Wessels, A. (2002). Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 247, 307-326.

Perner, B., Englert, C., and Bollig, F. (2007). The Wilms tumor genes *wt1a* and *wt1b* control different steps during formation of the zebrafish pronephros. *Dev Biol* 309, 87-96.

Pevny, L., and Placzek, M. (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* 15, 7-13.

Piechaczyk, M., and Farras, R. (2008).

Regulation and function of JunB in cell proliferation. *Biochem Soc Trans* 36, 864-867.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078-1080.

Poss, K.D. (2010). Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet* 11, 710-722.

Poss, K.D., Keating, M.T., and Nechiporuk, A. (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn* 226, 202-210.

Poss, K.D., Nechiporuk, A., Hillam, A.M., Johnson, S.L., and Keating, M.T. (2002a). *Mps1* defines a proximal blastemal proliferative compartment essential for zebrafish fin regeneration. *Development* 129, 5141-5149.

Poss, K.D., Shen, J., and Keating, M.T. (2000a). Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev Dyn* 219, 282-286.

Poss, K.D., Shen, J., Nechiporuk, A., McMahon, G., Thisse, B., Thisse, C., and Keating, M.T. (2000b). Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol* 222, 347-358.

Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002b). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188-2190.

Provost, E., Rhee, J., and Leach, S.D. (2007). Viral 2A peptides allow expression of multiple proteins from a single ORF in transgenic zebrafish embryos. *Genesis* 45, 625-629.

Qin, Z., Barthel, L.K., and Raymond, P.A. (2009). Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9310-9315.

Quint, E., Smith, A., Avaron, F., Laforest, L., Miles, J., Gaffield, W., and Akimenko, M.A. (2002). Bone patterning is altered in the

regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and bmp2b or exposure to cyclopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8713-8718.

Rao, N., Jhamb, D., Milner, D.J., Li, B., Song, F., Wang, M., Voss, S.R., Palakal, M., King, M.W., Saranjami, B., *et al.* (2009). Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs. *BMC Biol* 7, 83.

Rao, T.P., and Kuhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106, 1798-1806.

Raya, A., Koth, C.M., Buscher, D., Kawakami, Y., Itoh, T., Raya, R.M., Sternik, G., Tsai, H.J., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua-Belmonte, J.C. (2003). Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 *Suppl 1*, 11889-11895.

Rieger, S., and Sagasti, A. (2011). Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS Biol* 9, e1000621.

Rimini, R., Beltrame, M., Argenton, F., Szymczak, D., Cotelli, F., and Bianchi, M.E. (1999). Expression patterns of zebrafish sox11A, sox11B and sox21. *Mech Dev* 89, 167-171.

Rinkevich, Y., Lindau, P., Ueno, H., Longaker, M.T., and Weissman, I.L. (2011). Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. *Nature* 476, 409-413.

Rojas-Munoz, A., Rajadhyksha, S., Gilmour, D., vanBebber, F., Antos, C., Rodriguez Esteban, C., Nusslein-Volhard, C., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). ErbB2 and ErbB3 regulate amputation-induced proliferation and migration during vertebrate regeneration. *Dev Biol* 327, 177-190.

Roy, S., and Levesque, M. (2006). Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *ScientificWorldJournal* 6 *Suppl 1*, 12-25.

Ryckebusch, L., Wang, Z., Bertrand, N., Lin, S.C., Chi, X., Schwartz, R., Zaffran, S., and Niederreither, K. (2008). Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2913-2918.

Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M., and Nishinakamura, R. (2004). Sall1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 103-113.

Schafer, M., Rembold, M., Wittbrodt, J., Scharf, M., and Winkler, C. (2005). Medial floor plate formation in zebrafish consists of two phases and requires trunk-derived Midkine-a. *Genes Dev* 19, 897-902.

Schebesta, M., Lien, C.L., Engel, F.B., and Keating, M.T. (2006). Transcriptional profiling of caudal fin regeneration in zebrafish. *ScientificWorldJournal* 6 *Suppl 1*, 38-54.

Schnabel, K., Wu, C.C., Kurth, T., and Weidinger, G. (2011). Regeneration of cryoinjury induced necrotic heart lesions in zebrafish is associated with epicardial activation and cardiomyocyte proliferation. *PLoS One* 6, e18503.

Schultz, G.S., Davidson, J.M., Kirsner, R.S., Bornstein, P., and Herman, I.M. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair Regen* 19, 134-148.

Shaulian, E. (2010). AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal* 22, 894-899.

Shimazaki, M., Nakamura, K., Kii, I., Kashima, T., Amizuka, N., Li, M., Saito, M., Fukuda, K., Nishiyama, T., Kitajima, S., *et al.* (2008). Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *J Exp Med* 205, 295-303.

Sieger, D., Tautz, D., and Gajewski, M. (2003). The role of Suppressor of Hairless in Notch mediated signalling during zebrafish somitogenesis. *Mech Dev* 120, 1083-1094.

- Siekmann, A.F., and Lawson, N.D. (2007). Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* 445, 781-784.
- Sikorski, E.M., Uo, T., Morrison, R.S., and Agarwal, A. (2006). Pescadillo interacts with the cadmium response element of the human heme oxygenase-1 promoter in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 281, 24423-24430.
- Sleep, E., Boue, S., Jopling, C., Raya, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Transcriptomics approach to investigate zebrafish heart regeneration. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 11, 369-380.
- Smart, N., Bollini, S., Dube, K.N., Vieira, J.M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A.N., Lythgoe, M.F., *et al.* (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474, 640-644.
- Smith, A., Avaron, F., Guay, D., Padhi, B.K., and Akimenko, M.A. (2006). Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblasts differentiation and function. *Dev Biol* 299, 438-454.
- Snider, P., Standley, K.N., Wang, J., Azhar, M., Doetschman, T., and Conway, S.J. (2009). Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res* 105, 934-947.
- Snow, C.J., Peterson, M.T., Khalil, A., and Henry, C.A. (2008). Muscle development is disrupted in zebrafish embryos deficient for fibronectin. *Dev Dyn* 237, 2542-2553.
- Sousa, S., Afonso, N., Bensimon-Brito, A., Fonseca, M., Simoes, M., Leon, J., Roehl, H., Cancela, M.L., and Jacinto, A. Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development* 138, 3897-3905.
- Sousa, S., Afonso, N., Bensimon-Brito, A., Fonseca, M., Simoes, M., Leon, J., Roehl, H., Cancela, M.L., and Jacinto, A. (2011). Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development* 138, 3897-3905.
- Stainier, D.Y. (2001). Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev Genet* 2, 39-48.
- Stoick-Cooper, C.L., Moon, R.T., and Weidinger, G. (2007a). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes Dev* 21, 1292-1315.
- Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N., and Moon, R.T. (2007b). Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479-489.
- Sumida, A., Horiba, M., Ishiguro, H., Takenaka, H., Ueda, N., Ooboshi, H., Opthof, T., Kadomatsu, K., and Kodama, I. (2010). Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodelling and ameliorates cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res*.
- Summerton, J., and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-195.
- Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., Vignali, K.M., Dilioglou, S., Vanin, E.F., and Vignali, D.A. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22, 589-594.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biol* 8, 215.
- Takenaka, H., Horiba, M., Ishiguro, H., Sumida, A., Hojo, M., Usui, A., Akita, T., Sakuma, S., Ueda, Y., Kodama, I., *et al.* (2009). Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H462-469.
- Tal, T.L., Franzosa, J.A., and Tanguay, R.L. (2009). Molecular Signaling Networks

ThatChoreographEpimorphicFinRegeneration in Zebrafish - A Mini-Review. *Gerontology*.

Tamatani, M., Matsuyama, T., Yamaguchi, A., Mitsuda, N., Tsukamoto, Y., Taniguchi, M., Che, Y.H., Ozawa, K., Hori, O., Nishimura, H., *et al.* (2001). ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 7, 317-323.

Tanaka, E.M., and Reddien, P.W. (2011). The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell* 21, 172-185.

Thatcher, E.J., Paydar, I., Anderson, K.K., and Patton, J.G. (2008). Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18384-18389.

Thein, D.C., Thalhammer, J.M., Hartwig, A.C., Crenshaw, E.B., 3rd, Lefebvre, V., Wegner, M., and Sock, E. The closely related transcription factors Sox4 and Sox11 function as survival factors during spinal cord development. *J Neurochem* 115, 131-141.

Thummel, R., Bai, S., Sarras, M.P., Jr., Song, P., McDermott, J., Brewer, J., Perry, M., Zhang, X., Hyde, D.R., and Godwin, A.R. (2006). Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb. *Dev Dyn* 235, 336-346.

Thummel, R., Ju, M., Sarras, M.P., Jr., and Godwin, A.R. (2007). Both Hoxc13 orthologs are functionally important for zebrafish tail fin regeneration. *Dev Genes Evol* 217, 413-420.

Trinh, L.A., and Stainier, D.Y. (2004). Fibronectin regulates epithelial organization during myocardial migration in zebrafish. *Dev Cell* 6, 371-382.

Tsonis, P.A., Doane, K., and Del Rio-Tsonis, K. (1997). Expression of integrins during axolotl limb regeneration. *Dev Growth Differ* 39, 9-14.

Tsukamoto, Y., Kuwabara, K., Hirota, S., Ikeda, J., Stern, D., Yanagi, H., Matsumoto,

M., Ogawa, S., and Kitamura, Y. (1996). 150-kD oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified low density lipoprotein. *J Clin Invest* 98, 1930-1941.

Tsutsui, J., Uehara, K., Kadomatsu, K., Matsubara, S., and Muramatsu, T. (1991). A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 792-797.

Tu, S., and Johnson, S.L. (2011). Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Dev Cell* 20, 725-732.

van der Flier, A., Badu-Nkansah, K., Whittaker, C.A., Crowley, D., Bronson, R.T., Lacy-Hulbert, A., and Hynes, R.O. (2010). Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development. *Development* 137, 2439-2449.

von Gise, A., Zhou, B., Honor, L.B., Ma, Q., Petryk, A., and Pu, W.T. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through beta-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol* 356, 421-431.

Wagner, D.E., Wang, I.E., and Reddien, P.W. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* 332, 811-816.

Wagner, K.D., Wagner, N., and Schedl, A. (2003). The complex life of WT1. *J Cell Sci* 116, 1653-1658.

Wang, J., Panakova, D., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Gemberling, M., Burris, J.S., Singh, S.P., Dickson, A.L., Lin, Y.F., Sabeh, M.K., *et al.* (2011). The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development* 138, 3421-3430.

Wang, Y.X., Qian, L.X., Yu, Z., Jiang, Q., Dong, Y.X., Liu, X.F., Yang, X.Y., Zhong,

- T.P., and Song, H.Y. (2005). Requirements of myocyte-specific enhancer factor 2A in zebrafish cardiac contractility. *FEBS Lett* 579, 4843-4850.
- Wegner, M., and Stolt, C.C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci* 28, 583-588.
- White, J.A., Boffa, M.B., Jones, B., and Petkovich, M. (1994). A zebrafish retinoic acid receptor expressed in the regenerating caudal fin. *Development* 120, 1861-1872.
- Whitehead, G.G., Makino, S., Lien, C.L., and Keating, M.T. (2005). fgf20 is essential for initiating zebrafish fin regeneration. *Science* 310, 1957-1960.
- Widgerow, A.D. (2011). Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control. *Wound Repair Regen* 19, 117-133.
- Wills, A.A., Holdway, J.E., Major, R.J., and Poss, K.D. (2008a). Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development* 135, 183-192.
- Wills, A.A., Kidd, A.R., 3rd, Lepilina, A., and Poss, K.D. (2008b). Fgfs control homeostatic regeneration in adult zebrafish fins. *Development* 135, 3063-3070.
- Winkler, C., and Moon, R.T. (2001). Zebrafish mdk2, a novel secreted midkine, participates in posterior neurogenesis. *Dev Biol* 229, 102-118.
- Winkler, C., Schafer, M., Duschl, J., Scharl, M., and Volff, J.N. (2003). Functional divergence of two zebrafish midkine growth factors following fish-specific gene duplication. *Genome Res* 13, 1067-1081.
- Wyllie, A.H. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42, 4-9.
- Yamamoto, C., Fukuda, N., Matsumoto, T., Higuchi, T., Ueno, T., and Matsumoto, K. Zinc-finger transcriptional factor Sall1 induces angiogenesis by activation of the gene for VEGF-A. *Hypertens Res* 33, 143-148.
- Yates, C.C., Bodnar, R., and Wells, A. Matrix control of scarring. *Cell Mol Life Sci* 68, 1871-1881.
- Yin, V.P., Thomson, J.M., Thummel, R., Hyde, D.R., Hammond, S.M., and Poss, K.D. (2008). Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes Dev* 22, 728-733.
- Yoshinari, N., Ishida, T., Kudo, A., and Kawakami, A. (2009). Gene expression and functional analysis of zebrafish larval fin fold regeneration. *Dev Biol* 325, 71-81.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R., *et al.* (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454, 109-113.
- Zon, L.I. (2008). Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature* 453, 306-313.
- Zou, K., Muramatsu, H., Ikematsu, S., Sakuma, S., Salama, R.H., Shinomura, T., Kimata, K., and Muramatsu, T. (2000). A heparin-binding growth factor, midkine, binds to a chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. *Eur J Biochem* 267, 4046-4053.